

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

-----

**LÊ THỊ LÝ**

**NGHIÊN CỨU BIẾN NẠP GEN *DOF1* VÀO MÔ SẸO  
PHÔI HÓA GIỐNG SẴN *TMS 60444* THÔNG QUA VI  
KHUẨN *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS***

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 60420114

**LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC**

Cán bộ hướng dẫn: PGS. TS. Nguyễn Văn Đồng

Hà Nội, 2015

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

-----

**LÊ THỊ LÝ**

**NGHIÊN CỨU BIẾN NẠP GEN *DOF1* VÀO MÔ SẸO  
PHÔI HÓA GIỐNG SẴN *TMS 60444* THÔNG QUA VI  
KHUẨN *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS***

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 60420114

LUẬN VĂN THẠC SĨ KHOA HỌC

Cán bộ hướng dẫn: PGS. TS. Nguyễn Văn Đồng

Hà Nội, 2015

## LỜI CẢM ƠN

*Lời đầu tiên, tôi xin trân trọng cảm ơn các thầy, cô giáo tham gia giảng dạy ở Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật đã tận tình giảng dạy, dìu dắt tôi trong thời gian học tập tại Viện.*

*Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới PGS. TS. Nguyễn Văn Đồng người thầy đã tận tình chỉ bảo, hướng dẫn tôi trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu khoa học và thực hiện luận văn.*

*Tôi cũng xin được gửi lời cảm ơn chân thành tới toàn thể cán bộ và học viên làm việc tại Phòng thí nghiệm Trọng điểm Quốc gia Công nghệ Tế bào thực vật, Viện Di truyền Nông nghiệp đã hết lòng giúp đỡ tôi thực hiện thành công luận văn này.*

*Cuối cùng, tôi vô cùng biết ơn gia đình và bạn bè đã khích lệ, động viên, giúp đỡ và là chỗ dựa vững chắc cho tôi trong quãng thời gian qua.*

*Luận văn được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ Bộ Khoa học Công nghệ thông qua Hợp đồng Thực hiện nhiệm vụ hợp tác quốc tế về khoa học và công nghệ theo nghị định thư số: 08/2013/HĐ-NĐT. Tôi xin chân thành biết ơn sự hỗ trợ đó.*

**Hà Nội, tháng 12 năm 2015**

**Học viên**

**Lê Thị Lý**

## MỤC LỤC

MỞ ĐẦU.....	11
Chương 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU .....	13
1.1. Giới thiệu chung về cây sắn .....	13
1.1.1. Nguồn gốc và phân loại cây sắn .....	13
1.1.2. Vai trò của cây sắn.....	14
1.1.2.1. Vai trò của cây sắn đối với thế giới .....	14
1.1.2.2. Vai trò của cây sắn đối với Việt Nam.....	19
1.1.3. Giống sắn <i>TMS 60444</i> .....	21
1.2. Yếu tố phiên mã .....	21
1.2.1. Ứng dụng của yếu tố phiên mã trong chọn giống phân tử.....	21
1.2.2. Yếu tố phiên mã Dof1.....	23
1.3. Chuyển gen gián tiếp nhờ vi khuẩn <i>A. tumefaciens</i> .....	26
1.3.1. Cơ sở khoa học của phương pháp.....	26
1.3.2. Đặc điểm cấu trúc của vi khuẩn <i>Agrobacterium</i> .....	27
1.4. Tình hình nghiên cứu chuyển gen ở sắn .....	33
1.4.1. Tình hình nghiên cứu chuyển gen sắn trên thế giới.....	33
1.4.2. Tình hình chuyển gen sắn ở Việt Nam .....	36
Chương 2: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU .....	39
2.1. Vật liệu nghiên cứu .....	39
2.1.1. Mẫu thực vật .....	39
2.1.2. Vi khuẩn và các vector.....	39
2.1.3. Môi trường nghiên cứu .....	41

2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	42
2.2.1. Nghiên cứu khả năng tạo mô sẹo phôi hóa.....	42
2.2.2. Nghiên cứu quy trình chuyển gen vào mô sẹo phôi hóa.....	44
2.2.2.1. Chuẩn bị dung dịch khuẩn và biến nạp.....	44
2.2.2.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ cefotaxime đến khả năng loại khuẩn thừa và tái sinh cây từ mô sẹo phôi hóa sau biến nạp.....	45
2.2.2.3. Nghiên cứu nồng độ chất chọn lọc thực vật hygromycin thích hợp để chọn lọc mô được chuyển gen .....	45
2.2.2.4. Nghiên cứu khả năng tái sinh thành cây hoàn chỉnh từ mô sẹo phôi hóa sau biến nạp và chọn lọc cây chuyển gen .....	46
2.2.2.5. Phương pháp xác định sự có mặt của gen <i>Dof1</i> trong cây sau chuyển gen.....	46
2.2.3. Đánh giá các đặc tính nông sinh học của cây chuyển gen <i>Dof1</i> trong điều kiện nhà lưới .....	48
2.2.3.1. Phương pháp đưa cây ra đất và chăm sóc cây trong nhà lưới ....	48
2.2.3.2. Phương pháp đánh giá một số đặc tính nông sinh học của cây sản trồng ngoài đồng ruộng .....	48
Chương 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN .....	49
3.1. Kết quả tạo mô sẹo phôi hóa giống sản <i>TMS 60444</i> .....	49
3.2. Kết quả chuyển gen <i>Dof1</i> vào FEC giống sản <i>TMS 60444</i> .....	52
3.2.1. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của mật độ khuẩn đến hiệu quả biến nạp gen <i>Dof1</i> vào FEC giống sản <i>TMS 60444</i> .....	53
3.2.2. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của nhiệt độ đồng nuôi cấy đến khả năng tiếp nhận gen <i>Dof1</i> của FEC giống sản <i>TMS 60444</i> .....	55
3.2.3. Kết quả nghiên cứu hiệu quả diệt khuẩn của cefotaxime và ảnh hưởng của nó đến khả năng sống sót và tái sinh chồi từ FEC sau chuyển gen .....	57

3.2.4. Kết quả khảo sát hiệu quả gây chết của chất chọn lọc hygromycin .....	60
3.2.5. Kết quả chọn lọc và tái sinh cây chuyển gen sau biến nạp.....	62
3.2.6. Kết quả sàng lọc và phân tích PCR kiểm tra sự có mặt của gen <i>Dof1</i> trong cây sau chuyển gen .....	65
3.3. Kết quả đưa cây ra vườn ươm và đánh giá các đặc tính nông sinh học của cây chuyển gen <i>Dof1</i> .....	70
3.3.1. Kết quả đưa cây ra vườn ươm.....	70
3.3.2. Kết quả đánh giá các đặc tính nông sinh học của cây chuyển gen <i>Dof1</i> thế hệ T <sub>0</sub> sau 3 tháng trồng ra vườn ươm .....	72
3.3.3. Kết quả đánh giá các đặc tính nông sinh học của cây chuyển gen <i>Dof1</i> thế hệ T <sub>0</sub> sau 6 tháng trồng ra nhà lưới.....	74
KẾT LUẬN .....	78
KIẾN NGHỊ .....	78
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	80

## DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1: Thành phần hóa học của sắn và các sản phẩm sơ chế từ sắn so với các loại lương thực khác [12] .....	17
Bảng 2: Năng lượng cung cấp trực tiếp cho con người ở vùng nhiệt đới [12]. .....	18
Bảng 3: Khái quát các bước tạo mô sẹo phôi hóa ở sắn .....	43
Bảng 4: Thành phần và điều kiện phản ứng PCR sử dụng môi Dof1 F3/ Dof1 R3....	47
Bảng 5: Kết quả tạo FEC từ chồi nách và thùy lá non cây sắn <i>TMS 60444</i> in vitro ...	49
Bảng 6: Hiệu quả diệt khuẩn của cefotaxime và ảnh hưởng của nó đến tỉ lệ sống sót và khả năng tái sinh của FEC giống sắn <i>TMS 60444</i> (sau 8 tuần).....	58
Bảng 7: Kết quả chọn lọc và tái sinh FEC trên môi trường chứa hygromycin.....	63
Bảng 8: Kết quả đưa cây <i>TMS 60444</i> chuyển gen <i>Dof1</i> ra nhà lưới sau 1 tháng.....	71
Bảng 9: Bảng đánh giá các đặc tính nông sinh học của cây chuyển gen <i>Dof1</i> sau 3 tháng trồng trong nhà lưới.....	72
Bảng 10: Bảng đánh giá các đặc tính nông sinh học của cây chuyển gen <i>Dof1</i> sau 6 tháng so với đối chứng trong điều kiện nhà lưới .....	75



## DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình 1: Hình thái cây sắn [58].	14
Hình 2: Hoạt động của yếu tố phiên mã (TF)	22
Hình 3: Biểu hiện <i>Dof1</i> tăng sự biểu hiện của các gen <i>PEPC</i> , <i>PK</i> , <i>CS</i> và <i>ICDH</i> trong cây <i>Arabidopsis</i> chuyển gen <i>Dof1</i> .	24
Hình 4: Cấu tạo vi khuẩn <i>A. tumefaciens</i> [4]	27
Hình 5: Cấu trúc và sự biểu hiện của Ti-plasmid kiểu octopine và kiểu nopaline.	28
Hình 6: Sơ đồ cấu trúc của Ti-plasmid [90].	30
Hình 7: Cơ chế biến nạp của <i>Agrobacterium</i> vào tế bào thực vật [95].	32
Hình 8: Sơ đồ khái quát các hệ thống đang được sử dụng để tạo cây sắn chuyển gen [68]	35
Hình 9: Cây sắn <i>TMS 60444</i> in vitro 1 tháng tuổi	39
Hình 10: Sơ đồ vector pCAMBIA 1303 [75].	40
Hình 11: Sơ đồ vector pCAMBIA <i>Dof1</i> [75].	40
Hình 12: Cụm mô sẹo phân hóa giống sắn <i>TMS 60444</i>	44
Hình 13: Cụm mô sẹo giống sắn <i>TMS 60444</i> hình thành và phát triển trên các môi trường từ các nguồn vật liệu khác nhau.	51
Hình 14: Các khối FEC của <i>TMS 60444</i> hình thành và phát triển trên môi trường MMS.	52

Hình 15: Ảnh hưởng của các mật độ dịch khuẩn khác nhau đến khả năng tiếp nhận gen <i>Dof1</i> của FEC giống sắn <i>TMS 60444</i> .....	54
Hình 16: Ảnh hưởng của nhiệt độ đồng nuôi cây đến khả năng tiếp nhận gen <i>Dof1</i> của FEC giống sắn <i>TMS 60444</i> .....	56
Hình 17: Hiệu quả gây chết của hygromycin lên FEC của giống sắn <i>TMS 60444</i> sau 8 tuần .....	60
Hình 18: Các cụm FEC trong môi trường MMS bổ sung hygromycin ở các nồng độ khác nhau sau 8 tuần chọn lọc.....	62
Hình 19: Kết quả chọn lọc và tái sinh FEC trên môi trường tái sinh (MSN) chứa hygromycin qua các giai đoạn khác nhau. ....	64
Hình 20: Kết quả kiểm tra sự ra rễ của cây chuyển gen <i>Dof1</i> trên môi trường chứa kháng sinh hygromycin .....	66
Hình 21: Kết quả điện di DNA tổng số kiểm tra cây chuyển gen <i>Dof1</i> .....	67
Hình 22: Kết quả điện di sản phẩm PCR kiểm tra sự có mặt của gen <i>HPT</i> trong các cây chuyển gen .....	68
Hình 23: Kết quả điện di sản phẩm PCR kiểm tra sự có mặt của gen <i>Dof1</i> trong các cây chuyển gen.....	69
Hình 24: Kết quả đưa cây chuyển gen <i>Dof1</i> và cây đối chứng ra đất sau 1 tháng. ..	71
Hình 25: Cây <i>TMS 60444</i> chuyển gen <i>Dof1</i> và cây đối chứng sau 3 tháng trồng trong nhà lưới.....	73
Hình 26: Các cây <i>TMS 60444</i> chuyển gen <i>Dof1</i> và cây đối chứng sau 6 tháng trồng trong nhà lưới. ....	77
Hình 27: Một số hình ảnh về sự phân chạc của cây đối chứng.....	77