

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

VÌ THỊ XUÂN THỦY

**NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM VÀ BIỂU HIỆN GEN
LIÊN QUAN ĐẾN TÍNH KHÁNG MỘT PHÂN LẬP TỪ CÂY NGÔ**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Thái Nguyên, 2017

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

VÌ THỊ XUÂN THỦY

**NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM VÀ BIỂU HIỆN GEN LIÊN QUAN ĐẾN
TÍNH KHÁNG MỘT PHÂN LẬP TỪ CÂY NGÔ**

Chuyên ngành: Di truyền học

Mã số: 62 42 01 21

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC:

- 1. GS.TS. Chu Hoàng Mậu**
- 2. PGS.TS. Nguyễn Vũ Thanh Thanh**

Thái Nguyên, 2017

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi dưới sự hướng dẫn của GS.TS. Chu Hoàng Mậu và PGS.TS. Nguyễn Vũ Thanh Thanh. Các kết quả trình bày trong luận án là trung thực, một phần đã được công bố trong các Tạp chí khoa học - công nghệ, phần còn lại chưa được ai công bố trong bất kỳ công trình nào khác. Mọi trích dẫn đều ghi rõ nguồn gốc.

Thái Nguyên, tháng 4 năm 2017

TÁC GIẢ

Vì Thị Xuân Thủy

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc nhất tới GS.TS. Chu Hoàng Mậu, PGS.TS. Nguyễn Vũ Thanh Thanh đã trực tiếp hướng dẫn và thường xuyên chia sẻ, động viên khích lệ để tôi có được sự tự tin và lòng đam mê khoa học giúp tôi hoàn thành luận án này.

Tôi xin chân thành cảm ơn PGS.TS. Chu Hoàng Hà, PGS.TS. Lê Văn Sơn, TS. Phạm Bích Ngọc, Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tận tình giúp đỡ và tạo mọi điều kiện tốt nhất để tôi tiến hành các thí nghiệm tại Phòng Công nghệ tế bào thực vật và Phòng công nghệ ADN ứng dụng.

Tôi xin chân thành cảm ơn sự giúp đỡ của thầy cô và cán bộ Bộ môn Sinh học hiện đại & Giáo dục Sinh học, Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm Thái Nguyên. Được học tập và sinh hoạt chuyên môn tại tập thể khoa học nghiêm túc, ngoài việc nhận được những đóng góp quý báu, tôi còn có cơ hội trang bị cho mình về phương pháp nghiên cứu và những hiểu biết sâu sắc hơn về nhiều vấn đề Sinh học hiện đại.

Tôi xin cảm ơn các thầy cô giáo và cán bộ Khoa Sinh học, các thầy cô giáo và cán bộ Bộ phận đào tạo Sau đại học, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên đã giúp đỡ và tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi hoàn thành khoá học này.

Tôi xin cảm ơn Trường Đại học Tây Bắc, đồng nghiệp của tôi là thầy cô giáo, cán bộ Khoa Sinh - Hoá và các đơn vị chức năng đã tạo cho tôi mọi điều kiện thuận lợi về mặt quản lý trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Cuối cùng, tôi xin tỏ lòng tri ân đối với những người thầy, những đồng nghiệp, gia đình và bạn bè là những điểm tựa tinh thần vững chắc, đã giúp đỡ, động viên, khích lệ, chia sẻ những khó khăn và luôn đồng hành cùng tôi trong quá trình học tập của mình.

Thái Nguyên, tháng 4 năm 2017

TÁC GIẢ

Vì Thị Xuân Thủy

DANH MỤC NHỮNG TỪ VÀ CHỮ VIẾT TẮT

ABA	Abscisic Acid	
AS	Acetylseringone	
bp	base pairs	Cặp bazơ nito
cs		Cộng sự
Ct	Threshold of Cycle	Chu kỳ ngưỡng
DAB	3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride	
EST	Expressed Sequence Tag	Trình tự đánh dấu biểu hiện
ETDA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid	
FAO	Food and Agriculture Organization	Tổ chức Nông - Lương thế giới
GFP	Green Fluorescence Protein	Protein huỳnh quang xanh
GM	Germination Medium	Môi trường nảy mầm
Gus	β -Glucuronidase	
IPTG	IsoPropylThio- β -Galactoside	
LB	Luria Bertami	Môi trường dinh dưỡng cơ bản nuôi cấy vi khuẩn
MS	Murashige và Skoog, 1962	Môi trường dinh dưỡng cơ bản nuôi cấy mô thực vật
OD	Optical Density	Mật độ quang
PCR	Polymerase Chain Reaction	Phản ứng chuỗi trùng hợp
rZmDEF1	Recombinant ZmDEF1 protein	Protein tái tổ hợp ZmDEF1
RM	Rooting Medium	Môi trường tạo rễ
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction	Phản ứng chuỗi trùng hợp - phiên mã ngược

T-DNA	Transfer DNA	Đoạn DNA được chuyển vào thực vật
Ti-plasmid	Tumor inducing - plasmid	Plasmid gây khối u
TMB	3,3',5,5'-TetraMethyl Benzidine	
T ₀ , T ₁		Các thế hệ cây chuyển gen
T ₀		Cây chuyển gen tái sinh từ chồi trong ống nghiệm
T ₁		Hạt của cây chuyển gen T ₀ nảy mầm thành cây T ₁
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactose-pyranoside	
<i>ZmDEF1</i>		Gen <i>defensin1</i> ở ngô

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU	1
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	5
1.1. MỘT SỐ ĐẶC ĐIỂM CỦA CÂY NGÔ VÀ MỘT NGÔ	5
1.1.1. Giá trị của cây ngô và tác hại của một ngô	5
1.1.2. Đặc điểm hình thái, sinh lý, hóa sinh của ngô liên quan đến tính kháng một ngô..	11
1.2. ĐẶC ĐIỂM CỦA DEFENSIN THỰC VẬT	16
1.2.1. Cấu trúc, chức năng của defensin thực vật.....	16
1.2.2. Cơ chế ức chế α -amylase của defensin thực vật.....	21
1.2.3. Nghiên cứu defensin ở cây ngô.....	25
1.3. NGHIÊN CỨU CHUYỂN GEN Ở NGÔ	27
1.3.1. Nghiên cứu chuyển gen vào phôi non ngô thông qua <i>A. tumefaciens</i>	27
1.3.2. Một số thành tựu ứng dụng kỹ thuật chuyển gen ở ngô.....	30
Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	39
2.1. VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU	39
2.1.1. Vật liệu thực vật	39
2.1.2. Các chủng vi khuẩn và các loại vector	40
2.2. HOÁ CHẤT, THIẾT BỊ VÀ ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU	40
2.2.1. Hóa chất, thiết bị nghiên cứu	40
2.2.2. Địa điểm nghiên cứu	41
2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	41
2.3.1. Phương pháp đánh giá khả năng kháng một	42
2.3.2. Phương pháp tách dòng và giải tự trình tự gen <i>ZmDEF1</i>	44
2.3.3. Phương pháp thiết kế vector chuyển vào thực vật mang gen chuyển <i>ZmDEF1</i> ...	47
2.3.4. Phương pháp tạo cây chuyển gen thông qua vi khuẩn <i>A. tumefaciens</i>	50
Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN.....	61

3.1. ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG KHÁNG MỌT CỦA CÁC GIỐNG NGÔ NGHIÊN CỨU	61
3.1.1. Khối lượng hao hụt của các giống ngô nghiên cứu	61
3.1.2. Tỷ lệ tạo bột của các giống ngô nghiên cứu	62
3.1.3. Tỷ lệ nhiễm mốc của các giống ngô nghiên cứu	63
3.1.4. Hệ số gia tăng quần thể mốc của các giống ngô nghiên cứu	63
3.2. ĐẶC ĐIỂM GEN <i>ZmDEF1</i> PHÂN LẬP TỪ CÁC GIỐNG NGÔ NGHIÊN CỨU.....	66
3.2.1. Đặc điểm của gen <i>ZmDEF1</i> (cDNA) phân lập từ các giống ngô nghiên cứu	66
3.2.2. Đặc điểm của gen <i>ZmDEF1</i> phân lập từ DNA	71
3.2.3. Sự đa dạng về trình tự vùng mã hóa gen <i>ZmDEF1</i> ở ngô.....	73
3.3. BIỂU HIỆN GEN <i>ZmDEF1</i> Ở CÂY THUỐC LÁ CHUYỂN GEN	75
3.3.1. Thiết kế cấu trúc mang gen chuyển <i>ZmDEF1</i>	75
3.3.2. Chuyển cấu trúc pBetaPhaso- <i>ZmDEF1</i> vào cây thuốc lá nhờ <i>A. tumefaciens</i>	78
3.3.3. Phân tích cây thuốc lá chuyển gen.....	80
3.4. BIỂU HIỆN GEN <i>ZmDEF1</i> Ở CÂY NGÔ CHUYỂN GEN.....	89
3.4.1. Kết quả chuyển gen <i>gus</i> vào phôi ngô giống LVN99.....	89
3.4.2. Chuyển cấu trúc mang gen <i>ZmDEF1</i> vào phôi ngô nhờ <i>A. tumefaciens</i>	93
3.4.3. Xác định sự có mặt của gen chuyển <i>ZmDEF1</i> ở thể hệ cây ngô chuyển gen T ₀ ...	97
3.4.4. Phân tích biểu hiện protein <i>ZmDEF1</i> tái tổ hợp ở thể hệ T ₁	101
3.4.5. Kiểm tra chức năng sinh học của protein <i>ZmDEF1</i> tái tổ hợp ở thể hệ T ₁ ...	102
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ.....	105
1. Kết luận	105
2. Đề nghị.....	105
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	108

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 1.1. Mối tương quan giữa các thành phần hoá học với tính kháng mọt của hạt ngô .	14
Bảng 1.2. Các protein được mã hóa bởi các gen từ vi khuẩn <i>Bacillus thuringiensis</i> được chuyển vào cây ngô.....	32
Bảng 2.1. Các giống ngô sử dụng trong nghiên cứu.....	39
Bảng 2.2. Thống kê các trình tự môi sử dụng trong nghiên cứu.....	40
Bảng 2.3. Thành phần phản ứng PCR với Master Mix.....	45
Bảng 2.4. Thành phần phản ứng gắn gen <i>ZmDEF1</i> vào vector tách dòng pBT	46
Bảng 2.5. Thành phần môi trường LB lỏng và LB đặc.....	46
Bảng 2.6. Thành phần phản ứng cắt plasmid bằng enzyme giới hạn <i>BamHI</i>	47
Bảng 2.7. Thành phần phản ứng cắt plasmid pDON201-SLHEP-HA bằng <i>Sall</i> và <i>HindIII</i>	49
Bảng 2.8. Thành phần phản ứng trao đổi LR.....	49
Bảng 2.9. Thành phần phản ứng cắt plasmid bằng <i>HindIII</i>	50
Bảng 2.10. Thành phần môi trường tái sinh cây thuốc lá.....	51
Bảng 2.11. Thành phần môi trường tái sinh cây ngô chuyển gen.....	53
Bảng 2.12. Thành phần phản ứng cắt DNA tổng số bằng <i>SaII</i>	57
Bảng 2.13. Thành phần phản ứng Real-time RT-PCR	59
Bảng 2.14. Chu trình nhiệt độ của phản ứng Real-time RT-PCR.....	59
Bảng 3.1. Khối lượng hao hụt hạt của các giống ngô nghiên cứu sau các thời gian gây nhiễm mọt.....	61
Bảng 3.2. Tỷ lệ bột ngô tạo ra của các giống ngô nghiên cứu sau các thời gian gây nhiễm mọt.....	62
Bảng 3.3. Tỷ lệ nhiễm mọt của các giống ngô nghiên cứu sau các thời gian gây nhiễm.....	63

Bảng 3.4. Hệ số gia tăng quần thể một của các giống ngô nghiên cứu sau các thời gian gây nhiễm	64
Bảng 3.5. Chỉ số miễn cảm một tương đối (Sn) của các giống ngô nghiên cứu.....	65
Bảng 3.6. Sự sai khác về trình tự nucleotide trên vùng mã hóa gen <i>ZmDEF1</i> của các giống ngô nghiên cứu.....	69
Bảng 3.7. Sự sai khác về trình tự nucleotide gen <i>ZmDEF1</i> phân lập từ DNA của giống ngô địa phương SL và giống ngô lai LVN99.....	73
Bảng 3.8. Một số trình tự gen <i>ZmDEF1</i> để phân tích đa dạng di truyền.....	74
Bảng 3.9. Kết quả biến nạp cấu trúc pBetaPhaso- <i>ZmDEF1</i> vào cây thuốc lá C9-1.....	78
Bảng 3.10. Kết quả phân tích chu kỳ ngưỡng và tỷ lệ biểu hiện của gen <i>ZmDEF1</i> ở các cây thuốc lá chuyển gen thế hệ T ₁	84
Bảng 3.11. Kết quả phân tích khả năng ức chế α -amylase một ngô của protein <i>ZmDEF1</i> tái tổ hợp từ hạt cây thuốc lá chuyển gen T ₁	87
Bảng 3.12. Ảnh hưởng của mật độ <i>A. tumefaciens</i> , nồng độ acetosyringone (AS), thời gian nhiễm khuẩn đến hiệu quả chuyển gen <i>gus</i>	90
Bảng 3.13. Ảnh hưởng của tuổi phôi đến hiệu suất biểu hiện gen <i>gus</i> và tạo mô sẹo của giống ngô LVN99.....	91
Bảng 3.14. Nồng độ kanamycin (mg/l) cho ngưỡng chọn lọc phôi ngô LVN99 mang gen <i>gus</i>	92
Bảng 3.15. Kết quả tái sinh cây chuyển gen <i>ZmDEF1</i> của giống ngô LC1 và LVN99. .	96
Bảng 3.16. Kết quả phân tích khả năng ức chế α -amylase một ngô của protein tái tổ hợp <i>ZmDEF1</i> từ hạt cây ngô chuyển gen T ₁	103