

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

HOÀNG THỊ THAO

NGHIÊN CỨU TẠO CÂY ĐẬU XANH CHUYỂN GEN
CÓ KHẢ NĂNG KHÁNG MỘT

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận án này là công trình nghiên cứu của tôi được thực hiện dưới sự hướng dẫn của GS.TS. Chu Hoàng Mậu và PGS.TS. Nguyễn Vũ Thanh Thanh. Các số liệu, kết quả 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 3 năm 2017

Tác giả luận án

Hoàng Thị Thao

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc đến GS.TS. Chu Hoàng Mậu, PGS.TS. Nguyễn Vũ Thanh Thanh đã tận tình hướng dẫn và chỉ bảo trong suốt quá trình tôi nghiên cứu và hoàn thành đề tài luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn PGS.TS. Lê Văn Sơn và các cán bộ nghiên cứu Phòng Công nghệ ADN ứng dụng, Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã giúp đỡ và tạo điều kiện tốt nhất để tôi có thể hoàn thành các thí nghiệm nghiên cứu thuộc đề tài luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn các thầy cô Bộ môn Sinh học hiện đại & Giáo dục sinh học, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên đã tạo mọi điều kiện thuận lợi và có những góp ý sâu sắc cho tôi trong thời gian học tập, thực hiện luận án. Tôi xin cảm ơn các thầy cô và cán bộ Khoa Sinh học, các cán bộ Bộ phận đào tạo Sau đại học, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên đã giúp đỡ và tạo điều kiện thuận lợi cho tôi hoàn thành khoá học này.

Tôi xin trân trọng cảm ơn Ban lãnh đạo Trường Đại học Nông - Lâm Bắc Giang, chân thành cảm ơn các đồng nghiệp Khoa Nông học - Trường Đại học Nông Lâm Bắc Giang đã tạo điều kiện thuận lợi và giúp đỡ tôi trong quá trình học tập và công tác.

Tôi rất biết ơn những người thân trong gia đình, các bạn bè đã luôn động viên, khích lệ và chia sẻ những khó khăn cùng tôi trong suốt quá trình học tập và nghiên cứu.

Thái Nguyên, ngày tháng 3 năm 2017

TÁC GIẢ

Hoàng Thị Thao

MỤC LỤC

	<i>Trang</i>
LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	iv
MỤC LỤC	v
DANH MỤC CÁC TỪ VÀ CHỮ VIẾT TẮT	v
DANH MỤC CÁC BẢNG	vii
DANH MỤC CÁC HÌNH	viii
MỞ ĐẦU	1
1. Đặt vấn đề	1
2. Mục tiêu nghiên cứu	2
3. Nội dung nghiên cứu.....	3
4. Những đóng góp mới của luận án.....	3
5. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn	4
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	5
1.1. CÂY ĐẬU XANH, MỘT HẠI ĐẬU XANH VÀ SỰ THIẾT HẠI DO MỘT GÂY RA CHO ĐẬU XANH	5
1.1.1. Cây đậu xanh	5
1.1.2. Một đậu xanh và ảnh hưởng của một đến bảo quản hạt đậu xanh.....	8
1.1.3. Đánh giá khả năng kháng một của đậu xanh	13
1.2. DEFENSIN THỰC VẬT.....	14
1.2.1. Các nhóm defensin thực vật.....	14
1.2.2. Cấu trúc của defensin thực vật.....	16
1.2.3. Hoạt động ức chế của defensin thực vật.....	19
1.2.4. Một số nghiên cứu biểu hiện gen defensin thực vật	23
1.3. ỨNG DỤNG KỸ THUẬT CHUYỂN GEN VÀ BIỂU HIỆN GEN <i>DEFENSIN</i> THỰC VẬT Ở MỘT SỐ LOÀI ĐẬU THUỘC CHI <i>VIGNA</i> ...26	26
1.3.1. Ứng dụng kỹ thuật chuyển gen ở một số loài đậu thuộc chi <i>Vigna</i>	26
1.3.2. Hệ thống tái sinh <i>in vitro</i> và tạo cây đậu xanh chuyển gen	30

1.3.3. Một số thành tựu chuyển gen defensin ở thực vật.....	32
Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	35
2.1. VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU	35
2.1.1. Vật liệu thực vật.....	35
2.1.2. Các chủng vi khuẩn và các loại vector	36
2.2. HÓA CHẤT, THIẾT BỊ VÀ ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU	36
2.2.1. Hóa chất	36
2.2.2. Các loại thiết bị máy móc	36
2.2.3. Địa điểm nghiên cứu và hoàn thành luận án.....	37
2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	37
2.3.1. Phương pháp đánh giá khả năng kháng một của các giống đậu xanh nghiên cứu...37	
2.3.2. Phương pháp phân lập, tách dòng và xác định trình tự nucleotide.....39	
2.3.3. Thiết kế vector chuyển gen.....45	
2.3.4. Phương pháp tạo cây chuyển gen nhờ vi khuẩn <i>A. tumefaciens</i>48	
2.3.5. Nhóm phương pháp phân tích cây chuyển gen.....53	
2.3.6. Các phương pháp phân tích, xử lý số liệu	56
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	56
3.1. ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG KHÁNG MỘT VÀ PHÂN LẬP GEN <i>VrPDF1</i> CỦA CÂY ĐẬU XANH.....	57
3.1.1. Khả năng kháng một của các giống đậu xanh nghiên cứu	57
3.1.2. Khuếch đại và tách dòng gen <i>VrPDF1</i> từ giống đậu xanh Tầm TH và ĐX22 61	
3.1.3. Đặc điểm của gen <i>VrPDF1</i> phân lập từ hai giống đậu xanh Tầm TH và ĐX22 62	
3.1.4. Thảo luận về cấu trúc của protein defensin	67
3.1.5. Sự đa dạng về trình tự nucleotide trong vùng mã hoá của gen <i>VrPDF1</i> ở cây đậu xanh	68
3.2. THIẾT KẾ VECTOR CHUYỂN GEN <i>VrPDF1</i> VÀ PHÂN TÍCH HOẠT ĐỘNG CỦA VECTOR CHUYỂN GEN TRÊN CÂY THUỐC LÁ.....	71
3.2.1. Thiết kế vector biểu hiện ở hạt thực vật mang gen <i>VrPDF1</i> bằng kỹ thuật Gateway	71

3.2.2. Tạo cây thuốc lá chuyển gen <i>in vitro</i> mang gen <i>VrPDF1</i>	74
3.2.3. Kết quả phân tích sự có mặt của gen chuyển <i>VrPDF1</i> ở các dòng cây thuốc lá chuyển gen bằng kỹ thuật PCR và Southern blot.....	77
3.2.4. Phân tích sự biểu hiện protein VrPDF1 tái tổ hợp trên cây thuốc lá chuyển gen ở thế hệ T1	79
3.3. TẠO CÂY ĐẬU XANH CHUYỂN GEN VÀ BIỂU HIỆN PROTEIN TÁI TỔ HỢP VrPDF1 Ở GIỐNG ĐẬU XANH ĐX22	84
3.3.1. Chuyển cấu trúc pBetaPhaso- <i>VrPDF1</i> và tạo cây đậu xanh chuyển gen....	84
3.3.2. Xác định sự có mặt và sự hợp nhất của gen chuyển <i>VrPDF1</i> trong hệ gen cây đậu xanh chuyển gen	87
3.3.3. Phân tích sự biểu hiện của gen chuyển <i>VrPDF1</i> trong các dòng cây đậu xanh chuyển gen T1	90
3.3.4. Kiểm tra hoạt động ức chế α -amylase từ ấu trùng mọt của protein tái tổ hợp rVrPDF1 ở thế hệ T1	92
3.3.5. Thảo luận kết quả tăng cường biểu hiện protein VrPDF1 ở cây đậu xanh chuyển gen	95
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ.....	100
1. Kết luận.....	100
2. Đề nghị.....	100
CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN.....	101
TÀI LIỆU THAM KHẢO	102

DANH MỤC KÝ HIỆU, CÁC TỪ VÀ CHỮ VIẾT TẮT

µg	Microgam	
AS	Acetylseringone	
BAP	Benzylaminopurine	
bp	Base pair	Cặp bazơ nitơ
cs		Cộng sự
CCM	Cocultivation medium	Môi trường đồng nuôi cấy
cDNA	Complementary DNA	DNA bổ sung
CTAB	Hexadecyltrimethyl ammonium bromide	
Cys	Cysteine	
DEPC	Diethyl pyrocarbonate	
DNA	Deoxyribonucleic acid	
dNTP	Deoxyribonucleoside triphosphate	
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid	
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	Xét nghiệm ELISA
GM	Germination Medium	Môi trường nảy mầm
<i>Gus</i>	β-Glucuronidase	
HRP	Horseradish Peroxidase	
IAA	Indole Acetic acid	
IPTG	Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside	
Kb	Kilo base	
kDa	Kilo Dalton	
LB	Luria Bertani	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

mRNA	Messenger ribonucleic acid	
NAA	Naphthaleneacetic acid	
<i>NptII</i>	Neomycin phosphatransferaseII	Gen kháng kanamycine
OD	Optical density	Mật độ quang
PCR	Polymerase chain reaction	Phản ứng chuỗi polymerase
PDF1	Plant defensin type 1	Gen defensin 1 ở đậu xanh
RNA	Ribonucleic acid	
RM	Rooting medium	Môi trường tạo rễ
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction	Phản ứng chuỗi polymerase phiên mã ngược
rVrPDF1	Recombinant VrPDF1 protein	Protein defensin tái tổ hợp VrPDF1
ScFv	Single-chain variable fragment	
SDS	Sodium dodecyl sulfate	
SEM	Shoot Elongation Medium	Môi trường kéo dài chồi
SIM	Shoot Induction Medium	Môi trường tạo đa chồi
TAE	Tris Acetate EDTA	
<i>Taq</i> DNA polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> DNA polymerase	
T-DNA	Transfer DNA	Đoạn DNA được chuyển vào thực vật
Ti-plasmid	Tumor inducing – plasmid	Plasmid gây khối u
T0, T1		Các thế hệ cây chuyển gen
T0		Cây chuyển gen tái sinh từ chồi trong ống nghiệm
T1		Hạt của cây chuyển gen T0 nảy mầm thành cây T1
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine	
v/p		Vòng /phút
WT	Wild type	Kiểu dại
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galacto-pyranoside	

DANH MỤC CÁC BẢNG

	<i>Trang</i>
Bảng 1.1. Một số thực vật chuyển gen <i>defensin</i>	33
Bảng 2.1. Nguồn gốc các giống đậu xanh nghiên cứu	35
Bảng 2.2. Trình tự nucleotide của cặp mỗi đặc hiệu sử dụng trong PCR	39
Bảng 2.3. Thành phần phản ứng tổng hợp cDNA	41
Bảng 2.4. Các thành phần bổ sung phản ứng tổng hợp cDNA.....	41
Bảng 2.5. Thành phần phản ứng PCR nhân gen <i>VrPDF1</i>	42
Bảng 2.6. Chu trình nhiệt phản ứng nhân gen <i>VrPDF1</i>	42
Bảng 2.7. Thành phần phản ứng ghép nối gen <i>VrPDF1</i> vào vector tách dòng pBT	43
Bảng 2.8. Thành phần phản ứng ghép nối gen <i>VrPDF1</i> với vector pDON201-SLHEP-HA.....	46
Bảng 2.9. Thành phần phản ứng LR.....	47
Bảng 2.10. Thành phần các môi trường nuôi cấy <i>in vitro</i> cây đậu xanh.....	51
Bảng 3.1. Kết quả đánh giá khả năng kháng mọt của các giống đậu xanh qua các thời gian nhiễm mọt.....	59
Bảng 3.2. Các vị trí nucleotide sai khác giữa ba trình tự nucleotide của gen <i>VrPDF1</i>	64
Bảng 3.3. Các vị trí amino acid sai khác giữa ba trình tự amino acid suy diễn của gen <i>VrPDF1</i>	65
Bảng 3.4. Thống kê một số trình tự gen <i>PDF1</i> sử dụng trong phân tích đa dạng di truyền.....	69
Bảng 3.5. Hệ số tương đồng và hệ số phân ly của các giống đậu xanh dựa trên trình tự nucleotide của gen <i>VrPDF1</i>	69
Bảng 3.6. Hệ số tương đồng và hệ số phân ly của các giống đậu xanh dựa trên trình tự amino acid suy diễn của gen <i>VrPDF1</i>	70
Bảng 3.7. Kết quả biến nạp cấu trúc pBetaPhaso - <i>VrPDF1</i> vào mô lá thuốc lá.....	76
Bảng 3.8. Hoạt độ của α -amylase từ ấu trùng mọt đậu xanh trong các mẫu ủ với dịch chiết protein từ hạt của các dòng cây thuốc lá chuyển gen và từ hạt cây không chuyển gen	82
Bảng 3.9. Kết quả biến nạp cấu trúc pBetaPhaso- <i>VrPDF1</i> vào giống đậu xanh ĐX22	86
Bảng 3.10. Hoạt độ của α -amylase từ ấu trùng mọt đậu xanh trong các mẫu ủ với dịch chiết protein từ hạt của các dòng đậu xanh chuyển gen T1 và từ hạt cây không chuyển gen	93