

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

PHẠM MINH HẢO

NGHIÊN CỨU CHUYỂN GEN *GmDREB2*  
VÀO GIỐNG ĐẬU TƯƠNG ĐT12

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

THÁI NGUYÊN - 2017

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

PHẠM MINH HẢO

**NGHIÊN CỨU CHUYỂN GEN *GmDREB2*  
VÀO GIỐNG ĐẬU TƯƠNG ĐT12**

**Chuyên ngành: Di truyền học**

**Mã số: 60.42.01.21**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC**

**Người hướng dẫn khoa học: GS.TS. Chu Hoàng Mậu**

**THÁI NGUYÊN - 2017**

## **LỜI CAM ĐOAN**

Tôi xin cam đoan những nội dung trình bày trong luận văn là do tôi thực hiện dưới sự hướng dẫn của GS.TS Chu Hoàng Mậu và sự giúp đỡ, hợp tác của các đồng nghiệp trong nhóm nghiên cứu. Các số liệu, kết quả trình bày trong luận văn đã được sự đồng ý của cán bộ hướng dẫn và nhóm nghiên cứu. Mọi trích dẫn trong luận văn đều ghi rõ nguồn gốc.

*Thái Nguyên, tháng 4 năm 2017*

**Tác giả luận văn**

**Phạm Minh Hảo**

## LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới GS.TS Chu Hoàng Mậu đã tận tình hướng dẫn và tạo mọi điều kiện giúp đỡ tôi hoàn thành bản luận văn này.

Tôi xin chân thành cảm ơn sự giúp đỡ của các thầy cô giáo và cán bộ Bộ môn Sinh học hiện đại & Giáo dục sinh học, Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm-Đại học Thái Nguyên đã tạo điều kiện và giúp đỡ tôi trong quá trình học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận văn.

Tôi xin cảm ơn các cán bộ thuộc Phòng ADN ứng dụng, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm khoa học và Công nghệ Việt Nam đã nhiệt tình giúp đỡ tôi trong quá trình thực hiện đề tài.

Tôi xin được gửi lời cảm ơn chân thành đến gia đình, bạn bè, đồng nghiệp đã luôn động viên, khuyến khích, giúp đỡ và tạo mọi điều kiện để tôi có thể hoàn thành luận văn này.

*Thái Nguyên, tháng 4 năm 2017*

**Tác giả luận văn**

**Phạm Minh Hảo**

## MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN .....	i
LỜI CẢM ƠN .....	ii
MỤC LỤC .....	iii
DANH MỤC NHỮNG TỪ VIẾT TẮT .....	iv
DANH MỤC BẢNG .....	v
DANH MỤC HÌNH .....	vi
MỞ ĐẦU .....	1
1. Đặt vấn đề .....	1
2. Mục tiêu nghiên cứu .....	2
3. Nội dung nghiên cứu .....	2
4. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn .....	2
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU .....	3
1.1. Cây đậu tương và tác động của hạn đến đậu tương .....	3
1.1.1. Cây đậu tương .....	3
1.1.2. Tác động của hạn đến cây đậu tương .....	8
1.1.3. Cơ chế chịu hạn của đậu tương .....	9
1.2. Nhân tố phiên mã DREB .....	11
1.2.1. Các nhân tố phiên mã DREB ở đậu tương .....	11
1.2.2. Nhân tố phiên mã DREB2 .....	12
1.3. Ứng dụng kỹ thuật chuyển gen trong cải thiện khả năng chịu hạn của cây đậu tương .....	13
1.3.1. Các kỹ thuật chuyển gen ứng dụng ở cây đậu tương .....	13
1.3.2. Nghiên cứu chuyển gen ở cây đậu tương .....	15
Chương 2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP .....	17
2.1. Vật liệu, hóa chất, thiết bị, địa điểm nghiên cứu .....	17

2.1.1. Đặc điểm của giống đậu tương ĐT12 .....	17
2.1.2. Chủng <i>A. tumefaciens</i> tái tổ hợp chứa vector mang gen <i>GmDREB2</i> ...	18
2.1.3. Hóa chất và thiết bị.....	19
2.1.4. Địa điểm nghiên cứu.....	19
2.2. Phương pháp nghiên cứu .....	20
2.2.1. Phương pháp chuyển gen vào đậu tương .....	20
2.2.2. Phân tích cây chuyển gen .....	23
Chương 3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN .....	27
3.1. Kết quả chuyển gen <i>GmDREB2</i> và tái sinh cây đậu tương chuyển gen..	27
3.1.1. Kết quả khử trùng hạt và tạo nguyên liệu biến nạp .....	27
3.1.2. Lây nhiễm và tái sinh cây đậu tương chuyển gen.....	28
3.2. Phân tích sự có mặt của gen chuyển <i>GmDREB2</i> trong cây đậu tương chuyển gen ở thế hệ T0 .....	33
3.3. Thảo luận .....	37
3.3.1. Thảo luận về vector pBI121 và promoter 35S.....	37
3.3.2. Thảo luận về kết quả biến nạp, tái sinh cây chuyển gen và xác định sự có mặt của gen chuyển trong cây chuyển gen.....	37
3.3.3. Thảo luận về hiệu suất chuyển gen ở đậu tương .....	39
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ .....	41
1. Kết luận .....	41
2. Kiến nghị.....	41
TÀI LIỆU THAM KHẢO .....	42

**DANH MỤC NHỮNG TỪ VIẾT TẮT**

ABA	: Absisic Acid
Bp	: Cặp base
DEPC	: Diethyl pyrocarbonate
DNA	: Deoxyribonucleic Acid
DREB	: Dehydration - Responsive Element Binding dNTP Deoxy Nucleotide Triphosphate
Đtg	: Đồng tác giả
E. coli	: Escherichia coli
EDTA	: Ethylene diamine tetra- acetic acid
Kb	: Kilo base
LB	: Luria Bertani
OD	: Optical density
PCR	: Polymerase Chain Reaction - Phản ứng chuỗi RNA Ribonucleic Acid
TAE	: Tris - Acetate - EDTA
Taq	: Thermus aquaticus
T0	: Thế hệ cây chuyển gen T0 (cây chuyển gen tái sinh từ chồi trong ống nghiệm)
v/p	: vòng / phút
X-gal	: 5-bromo-4-chloro-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside

**DANH MỤC BẢNG**

Bảng 2.1. Thành phần các loại môi trường tái sinh <i>in vitro</i> ở đậu tương.....	20
Bảng 2.2. Thành phần đệm tách DNA tổng số.....	23
Bảng 2.3. Trình tự nucleotide của các cặp mồi PCR.....	24
Bảng 2.4. Thành phần của phản ứng PCR.....	25
Bảng 2.5. Chu kì nhiệt của phản ứng PCR.....	25
Bảng 3.1. Kết quả biến nạp gen <i>GmDREB2</i> vào giống đậu tương ĐT12.....	32



## DANH MỤC HÌNH

Hình 2.1. Hạt của giống đậu tương ĐT12 .....	17
Hình 2.2. Sơ đồ cấu trúc vector chuyển gen pBI121 mang gen <i>GmDREB2</i> ...	18
Hình 2.3. Sơ đồ thí nghiệm chuyển gen vào đậu tương qua nách lá mầm.....	21
Hình 3.1. Giai đoạn chuẩn bị mẫu biến nạp .....	27
Hình 3.2. Giai đoạn gây tổn thương nách lá mầm và biến nạp .....	28
Hình 3.3. Giai đoạn tạo đa chồi và kéo dài chồi.....	30
Hình 3.4. Giai đoạn ra rễ và trồng cây đậu tương chuyển gen ĐT12 trên giá thể.....	31
Hình 3.5. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm DNA tổng số ở thế hệ T0.....	33
Hình 3.6. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR xác định sự có mặt của đoạn promoter 35S của cấu trúc mang gen chuyển <i>GmDREB2</i> trong các cây đậu tương chuyển gen.....	34
Hình 3.7. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR xác định sự có mặt của gen chuyển <i>GmDREB2</i> bằng cặp mồi GmDREB2-BamHI/GmDREB2-Cmyc-SacI từ hệ gen các cây đậu tương chuyển gen ở thế hệ T0. ....	35

## MỞ ĐẦU

### 1. Đặt vấn đề

Đậu tương (*Glycine max* (L.) Merrill) còn gọi là đậu nành là một cây trồng cạn ngắn ngày có giá trị kinh tế cao. Khó có thể có tìm thấy một cây trồng nào có tác dụng nhiều mặt như cây đậu tương [5]. Việt Nam là nước nông nghiệp nhiệt đới, trồng đậu tương với ba mục đích là giải quyết vấn đề thiếu protein cho con người và gia súc, xuất khẩu và cải tạo đất. Cả nước đã hình thành 6 vùng sản xuất đậu tương, đó là vùng Nam Bộ, miền núi Bắc Bộ, đồng bằng sông Hồng, đồng bằng sông Cửu Long, đồng bằng ven biển miền Trung và Tây Nguyên. Tuy nhiên, sản lượng đậu tương của nước ta vẫn thấp, nên vẫn phải nhập khẩu từ các nước để đáp ứng nhu cầu tiêu dùng và làm thức ăn cho gia súc [1].

Trong những năm gần đây, hiện tượng biến đổi khí hậu đã ảnh hưởng nghiêm trọng đến nhiều nước trên thế giới và trong đó có Việt Nam. Đặc biệt là hiện tượng nóng lên của trái đất, dẫn đến tình trạng thiếu nước trầm trọng ở một số nơi. Điều này đã ảnh hưởng rất lớn tới ngành nông nghiệp của nước ta, trong đó có cây đậu tương. Đậu tương là cây mẫn cảm với điều kiện ngoại cảnh và thuộc nhóm cây chịu hạn kém, khi thiếu nước ở các thời kỳ khác nhau sẽ làm giảm năng suất và chất lượng cây trồng. Đặc tính chịu hạn ở cây đậu tương là tính trạng đa gen, sản phẩm của các gen này liên quan trực tiếp đến sự biểu hiện của đặc tính chịu hạn hoặc có chức năng điều hòa nhóm gen chịu hạn. Cho đến nay, các nhà khoa học vẫn chưa xác định được gen quyết định đến khả năng chịu hạn của thực vật.

Để chống lại điều kiện bất lợi của ngoại cảnh, đặc biệt là hạn hán cơ thể thực vật đã sản xuất ra nhiều loại protein, trong đó có DREB. DREB có vai trò kích thích hoạt động phiên mã của nhóm gen chịu hạn, đây là nhân tố phiên mã đóng vai trò quan trọng trong sự biểu hiện gen chịu hạn của cây đậu