

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

TRẦN THỊ HƯƠNG GIANG

Nghiên cứu chuyển gen GS1 tăng cường sử dụng hiệu quả nitơ vào thuốc lá và Bạch đàn urô (*Eucalyptus urophylla*)”.

THÁI NGUYÊN 2014

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU	1
Chương 1.....	6
TỔNG QUAN TÀI LIỆU	6
1.1. Công nghệ sinh học trong tạo cây trồng chuyển gen sinh trưởng nhanh.....	6
1.1.1. Vai trò của nitơ đối với thực vật	6
1.1.2. Cây chuyển gen tăng cường đồng hóa nitơ, sinh trưởng nhanh	7
1.2. Giới thiệu về gen tăng cường sử dụng hiệu quả nitơ (GS1).....	9
1.3. Giới thiệu chung về thuốc lá và Bạch đàn Urô	11
1.3.1. Cây thuốc lá cây mô hình cho nghiên cứu chuyển gen	11
1.3.2. Giới thiệu về bạch đàn urô	12
Chương 2.....	13
VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	13
2.1. Vật liệu, hóa chất và thiết bị sử dụng	13
2.1.1. Vật liệu	13
2.1.2. Hóa chất và thiết bị sử dụng.....	14
2.2. Địa điểm và thời gian	17
2.3. Phương pháp nghiên cứu.....	17
2.3.1. Phương pháp nghiên cứu chuyển gen vào thuốc lá.....	18
2.3.2. Phương pháp nghiên cứu tạo các dòng Bạch đàn urô	21
Chương 3.....	30
KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	30
3.1. Tạo các dòng thuốc lá chuyển gen GS1 và đánh giá sinh trưởng ở phạm vi phòng thí nghiệm..	30
3.1.1. Kết quả chuyển cấu trúc gen GS1 vào dòng thuốc lá K326	30
3.1.2. Kiểm tra các dòng thuốc lá chuyển gen GS1 bằng PCR.....	34
3.1.3. Phân tích, đánh giá sinh trưởng các dòng thuốc lá chuyển gen.....	35
3.2. Kết quả tạo các dòng Bạch đàn urô chuyển gen GS1.....	37
3.2.1. Kết quả chuyển cấu trúc gen GS1 vào Bạch đàn urô.....	37
Bảng 3.3. Kết quả chuyển gen GS1 vào Bạch đàn urô.....	43
3.2.2. Kiểm tra các dòng Bạch đàn urô chuyển gen bằng phương pháp PCR.....	46
Bảng 3.4. Hàm lượng và độ sạch của các mẫu DNA tổng số.	48
3.2.3. Kiểm tra các dòng Bạch đàn urô chuyển gen bằng kỹ thuật lai southern	54
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	55
TÀI LIỆU THAM KHẢO	56

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới TS. Bùi Văn Thắng- Viện trưởng Viện Công nghệ sinh học Lâm nghiệp, Trường Đại học Lâm nghiệp đã tận tình hướng dẫn, tạo mọi điều kiện thuận lợi, giúp đỡ tôi trong suốt thời gian thực hiện và hoàn thành luận văn.

Tôi xin trân trọng cảm ơn PGS.TS. Chu Hoàng Hà- Viện trưởng Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã giúp đỡ và tạo điều kiện cho tôi hoàn thành tốt quá trình học tập, thực hiện nghiên cứu đề tài và hoàn chỉnh luận văn.

Tôi muốn bày tỏ biết ơn tới TS. Phạm Bích Ngọc- Phó Trưởng phòng Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tạo mọi điều kiện thuận lợi, ủng hộ và giúp đỡ tôi trong suốt quá trình học tập, nghiên cứu và hoàn thành luận văn.

Tôi xin chân thành cảm ơn ThS. Bùi Phương Thảo và CN. Nguyễn Văn Đoàn- Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học thuộc Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã cộng tác giúp đỡ tôi hoàn thành luận văn.

Tôi xin chân thành cảm ơn sự giúp đỡ nhiệt tình của toàn thể cán bộ Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học trong quá trình làm luận văn.

Tôi xin chân thành cảm ơn các thầy cô và các cán bộ thuộc cơ sở đào tạo Viện Sinh thái và tài nguyên sinh vật, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam, đã giảng dạy và tạo điều kiện cho tôi hoàn thành khóa học.

Cuối cùng tôi rất biết ơn những người thân trong gia đình đã luôn bên tôi động viên, quan tâm tạo mọi điều kiện cho tôi học tập và nghiên cứu.

Hà Nội, ngày 26 tháng 12 năm 2015

Học viên

Trần Thị Hương Giang

MỘT SỐ TỪ VIẾT TẮT TRONG LUẬN VĂN

AS	Acetosyringone
ADP	Adenosine diphosphat
ATP	Adenosine triphosphat
BAP	Benzyl Amino Purine
Cs	Cộng sự
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTP	Deoxynucleotide
EDTA	Ethylene diamine tetra-acetic acid
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
IBA	Indol-3-Butyric Acid
Knop	Môi trường Sachs & Knop (1860)
Kb	kilo base
kDa	kilo Dalton
LB	Môi trường nuôi cấy Luria and Betani
MS	Môi trường cơ bản Murashige và Skoog (1962)
NAA	Naphthyl Acetic Acid
OD	Optical density
PCR	Polymerase Chain Reaction
Bp	Bazo pair
RNA	Ribonucleic
SDS	Sodium dodecyl sulfate

DANH MỤC BẢNG

Bảng 2.1. Môi trường nuôi cấy vi khuẩn.....	15
Bảng 2.2. Môi trường nuôi cấy thuốc lá.....	15
Bảng 2.3. Môi trường nuôi cấy Bạch đàn	16
Bảng 2.4. Thành phần của phản ứng PCR kiểm tra cây chuyển gen	20
Bảng 2.5. Chu trình nhiệt của phản ứng PCR.....	20
Bảng 3.1. Tỷ lệ tái sinh/ sống sót của các mẫu biến nạp qua các giai đoạn (%)	33
Bảng 3.2. Bảng so sánh chiều cao cây đối chứng và cây chuyển gen GS1	36
Bảng 3.3. Kết quả chuyển gen GS1 vào Bạch đàn urô	43
Bảng 3.4. Hàm lượng và độ sạch của các mẫu DNA tổng số.....	48

DANH MỤC HÌNH ẢNH

Hình 1.1. Kết quả trồng khảo nghiệm dòng Dương lai chuyển gen gs1.....	9
Hình 2.1. Sơ đồ vector chuyển gen pBI121:GS1.....	14
Hình 2.2. Sơ đồ thí nghiệm tổng quát.....	17
Hình 3.1. Sơ đồ quy trình chuyển gen GS1 vào thuốc lá K326 thông qua vi khuẩn <i>A. tumefaciens</i>	31
Hình 3.2. Chủng vi khuẩn <i>A. tumefaciens</i>	32
Hình 3.3. Biến nạp và đồng nuôi cấy.	32
Hình 3.4. Mảnh lá trên môi trường chọn lọc sau 2 tuần.....	34
Hình 3.5. Cây thuốc lá chuyển gen GS1 trên môi trường chọn lọc CL-TL ₅₀	34
Hình 3.6. Sản phẩm PCR nhân gen GS1	35
Hình 3.7. Cây thuốc lá K326 trồng trên giá thể.....	36
Hình 3.8. Cây thuốc lá K326, 5 tháng tuổi.	37
Hình 3.9. Tạo nguồn vật liệu chuyển gen	38
Hình 3.10. Thân mầm và lá mầm trên môi trường tiền nuôi cấy	39
Hình 3.11. Thân mầm và lá mầm trên môi trường đồng nuôi cấy	41
Hình 3.12. Mẫu bạch đàn trên môi trường tái sinh có bổ sung kháng sinh diệt khuẩn.....	42
Hình 3.13. Quá trình sàng lọc thể nhận gen của đoạn thân mầm.....	43
Hình 3.14. Quá trình sàng lọc thể nhận gen của mảnh lá mầm	44
Hình 3.15. Chồi tái sinh trên môi trường chọn lọc từ mẫu thân mầm và lá mầm sau 6 tuần nuôi cấy	45
Hình 3.16. Chồi Bạch đàn urô sau 3 tuần nuôi cấy trên môi trường ra rễ	45
Hình 3.17. Các dòng Bạch đàn chuyển gen GS1 trồng trong chậu đất 2 tuần tuổi... ..	46
Hình 3.18. Các dòng Bạch đàn chuyển gen GS1 trồng trong chậu đất 3 tháng tuổi ..	46
Hình 3.19a. DNA tổng số tách chiết từ mẫu lá Bạch đàn urô chuyển gen GS1, điện di trên gel agarose 0,8%	47
Hình 3.19b. DNA tổng số tách chiết từ mẫu lá Bạch đàn urô chuyển gen GS1, điện di trên gel agarose 0,8%.....	47
Hình 3.20. Sản phẩm PCR nhân đoạn gen GS1 từ các dòng Bạch đàn urô chuyển gen.	50

Hình 3.21. Sản phẩm PCR nhân gen <i>nptII</i> từ các dòng Bạch đàn urô giả định chuyển gen.....	51
Hình 3.22. Sản phẩm PCR nhân đoạn 35S-Promoter từ các dòng Bạch đàn urô giả định chuyển gen	52
Hình 3.23. Sản phẩm PCR nhân đoạn NOS-T từ các dòng Bạch đàn urô giả định chuyển gen.....	54
Hình 3.24. Kết quả Southern blot các mẫu bạch đàn chuyển gen GS1 và <i>nptII</i>	55

MỞ ĐẦU

Nitơ một trong những nguyên tố cần thiết và đóng vai trò quan trọng nhất cho quá trình sinh trưởng và phát triển của thực vật, là nhân tố cấu trúc cơ bản nên các phân tử axit nucleic và protein trong tế bào. Trong cây, nitơ có thể được đồng hóa hoặc tái sử dụng thông qua các cơ chế đồng hoá nitơ từ môi trường và nitơ giải phóng từ các quá trình quang hô hấp và các quá trình trao đổi chất khác như quá trình sinh tổng hợp phenyl propanoid và sự huy động nitơ trong một vài protein.

Glutamine synthetase (GS, EC 6.3.1.2) xúc tác cho phản ứng chuyển hóa axit glutamic thành glutamine phụ thuộc vào ATP, dùng amoniac như một cơ chất (Mifflin và Lea, 1980) có tác dụng làm biến đổi tất cả nitrogen ở dạng vô cơ tích hợp vào các hợp chất hữu cơ như: các protein và axit nucleic, chất diệp lục, cytochrome, phytochrome.v.v. (Stephanie và cs, 2009).

Có hai dạng chính là glutamine synthetase ở tế bào chất (GS1), tìm thấy trong tế bào chất của lá và các tổ chức không quang hợp và glutamine synthetase ở lục lạp (GS2) chỉ có trong lục lạp của các mô tham gia vào quá trình quang hợp và plastid của rễ. Trong đó, GS1 có vai trò đặc biệt quan trọng trong việc đồng hóa và tái sử dụng nitơ (Dubois và cs, 1996; Cren và Hirel, 1999; Stephanie và cs, 2009). GS1 là một octamer protein/enzyme bao gồm các tiểu đơn vị nhỏ hơn, có khối lượng phân tử khoảng 38 - 41kDa phụ thuộc vào các loài khác nhau. Trong một số loài, như thuốc lá, cà chua, thông,v.v. GS1 của lá được cấu tạo từ các dạng tiểu đơn vị có kích thước giống nhau, nhưng ở các đối tượng khác, ví dụ như cây đậu nành phân tử GS1 được cấu tạo bởi hai tiểu đơn vị có kích thước khác nhau (Becker và cs, 1992; Canton và cs, 1999; Dubois và cs, 1996). Thêm vào đó, các thí nghiệm phân tích bằng điện di hai chiều xác định ở cây đậu Pháp, phân tử GS1 được tạo thành từ hai chuỗi polypeptid khác nhau. Tuy nhiên, điều đáng chú ý ở sự khác nhau này sẽ liên quan đến sự hoạt động của enzyme và chức năng sinh lý của chúng. Những khảo sát xa hơn về mối quan hệ giữa cấu trúc và chức năng của các polypeptid của GS1, những nghiên cứu sử dụng đột biến gen trong ống nghiệm đã tiến hành và xác nhận được vai trò quan trọng của các axit amin

chìa khoá trong tính chất xúc tác của enzyme (Clemente và Marquez, 1999). Tăng cường hoạt động của GS1 sẽ giúp cây sử dụng hiệu quả nguồn nitơ vốn là nhu cầu thiết yếu cho cây sinh trưởng. Nhiều kết quả nghiên cứu cho thấy, nếu gen GS1 hoạt động mạnh thì cây trồng trong điều kiện đầy đủ hoặc nghèo nguồn nitơ cây vẫn có khả năng sinh trưởng nhanh (Stephanie và cs, 2009).

Một kết quả nghiên cứu chuyển gen GS1 vào cây lâm nghiệp tiêu biểu là: Gallardo và cs (1999) đã nghiên cứu chuyển cấu trúc gen GS1 dưới sự điều khiển của promoter 35S vào cây Dương lai (*Populus tremula x P.alba 7171*), kết quả cho thấy cây chuyển gen sinh trưởng nhanh hơn so với cây đối chứng là 76% (cây 2 tháng tuổi) và 21,3% (cây 6 tháng tuổi). Các dòng Dương lai chuyển gen GS1 đã được trồng khảo nghiệm từ năm 2000 tại tỉnh Granada của Tây Ban Nha, kết quả các dòng cây chuyển gen GS1 có mức độ biểu hiện enzyme glutamine synthetase cao và có tốc độ sinh trưởng nhanh hơn so với giống gốc không chuyển gen (chiều cao của cây chuyển gen tăng hơn so với cây không chuyển gen là 21% đối với cây trồng 1 năm tuổi, 36% đối với cây trồng 2 năm tuổi và 41% đối với cây trồng 3 năm tuổi) (Zhong và cs, 2004).

Bạch đàn urô (*Eucalyptus urophylla*) là một trong những loài Bạch đàn chính được trồng chủ yếu ở Việt Nam. Đây cũng là loài cây chủ lực trong dự án trồng mới 5 triệu hecta rừng đã được triển khai trong cả nước giai đoạn 1998 - 2010. Các nghiên cứu về tỷ trọng gỗ, hàm lượng xenlulozo, chiều dài sợi gỗ, v.v. đã được thực hiện, kết quả thu được cho thấy các tính trạng sinh trưởng và chất lượng gỗ ảnh hưởng lớn đến hiệu suất bột giấy cho ngành công nghiệp giấy. Các đánh giá về sinh trưởng của Bạch đàn urô tại Việt Nam cũng cho thấy tỷ lệ sinh trưởng của Bạch đàn urô tại Việt Nam chậm hơn so với các nước khác như Trung Quốc, Brazil (Nguyễn Đức Kiên, 2009). Vì vậy, các chương trình chọn giống bạch đàn ở Việt Nam tập trung chủ yếu vào tăng khả năng sinh trưởng, cải thiện chất lượng gỗ và tăng sức chống chịu với điều kiện môi trường bất lợi.

Thuốc lá là loại cây mô hình được sử dụng hiệu quả cho chuyển gen, kiểm tra sự biểu hiện của gen ngoại lai phục vụ cho mục đích chuyển gen vào cây mục tiêu. Trong khuôn khổ đề tài chúng tôi tiến hành thí nghiệm chuyển

gen GS1 vào cây thuốc lá để đánh giá hoạt động của gen chuyển, tạo cơ sở cho việc chuyển gen GS1 vào cây Bạch đàn urô có khả năng sử dụng hiệu quả nguồn nitơ để cây sinh trưởng nhanh phục vụ cho công tác cải thiện giống cây trồng.

Xuất phát từ cơ sở khoa học và nhu cầu ứng dụng vào thực tiễn, chúng tôi thực hiện đề tài: “Nghiên cứu chuyển gen GS1 tăng cường sử dụng hiệu quả nitơ vào thuốc lá và Bạch đàn urô (*Eucalyptus urophylla*)”.

1. Mục đích nghiên cứu

Tạo được các dòng cây thuốc lá K326 và các dòng cây Bạch đàn urô chuyển gen GS1 tăng cường sử dụng hiệu quả nitơ.

2. Nhiệm vụ nghiên cứu

2.1. Chuyển cấu trúc gen GS1 vào dòng thuốc lá K326 và phân tích, đánh giá sinh trưởng ở phạm vi phòng thí nghiệm.

Biến nạp cấu trúc gen GS1 vào dòng thuốc lá K326;

Kiểm tra sự có mặt của gen GS1 trong các dòng thuốc lá chuyển gen bằng phương pháp PCR.

Đánh giá về hình thái, sinh trưởng của các dòng thuốc lá chuyển gen GS1 tăng cường khả năng tổng hợp nitơ so với cây thuốc lá đối chứng không chuyển gen (WT).

2.2. Tạo các dòng Bạch đàn urô chuyển gen GS1

Biến nạp cấu trúc gen GS1 vào Bạch đàn Urô

Kiểm tra sự có mặt của gen GS1 trong các dòng Bạch đàn urô chuyển gen bằng phương pháp PCR và phương pháp southern blot.

3. Đối tượng và phạm vi nghiên cứu

3.1. Đối tượng nghiên cứu

Chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* C58 mang vector chuyển gen pBI121-35S/GS1 có kích thước khoảng 13kb chứa gen GS1 dưới sự điều khiển của promoter 35S và gen *nptII* dưới sự điều khiển của NOS-promoter do Phòng Công nghệ tế bào thực vật -Viện Công nghệ sinh học-Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam cung cấp.