

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT**



NGUYỄN THỊ THU

**CHUYÊN GEN *BT2* VÀO MỘT SỐ DÒNG NGÔ TRỒNG BẰNG SỬ
DỤNG MÔ PHÂN SINH VÀ *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS***

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Hà Nội, Tháng 11-2015

**VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM
VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT**



NGUYỄN THỊ THU

**CHUYỂN GEN *BT2* VÀO MỘT SỐ DÒNG NGÔ TRỒNG BẰNG SỬ
DỤNG MÔ PHÂN SINH VÀ *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS***

NGÀNH: SINH HỌC THỰC NGHIỆM

MÃ NGÀNH: 60 42 30

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC

PGS. TS. Nguyễn Đức Thành

Hà Nội, Tháng 11-2015

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của riêng tôi. Các số liệu, kết quả nêu trong luận án là trung thực và chưa từng được ai công bố.

Hà Nội, ngày tháng năm 2015

Tác giả

Nguyễn Thị Thu

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới PGS. TS. Nguyễn Đức Thành đã tận tình hướng dẫn, chỉ bảo và tạo mọi điều kiện giúp đỡ tôi hoàn thành công trình nghiên cứu này.

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn đặc biệt đến TS. Lê Thị Bích Thủy và tập thể cán bộ Phòng Di truyền tế bào thực vật đã giúp đỡ tôi về mặt tinh thần, cũng như tạo mọi điều kiện về vật chất, các phương tiện kỹ thuật cho tôi trong suốt quá trình thực hiện đề tài.

Tôi xin chân thành cảm ơn các thầy cô trong Ban Đào tạo Viện Sinh thái và Tài nguyên Sinh vật – Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã giúp đỡ và tạo điều kiện thuận lợi để tôi hoàn thành chương trình đào tạo.

Cuối cùng tôi xin cảm ơn sự động viên, khích lệ của gia đình, bạn bè và đồng nghiệp trong suốt thời gian làm luận văn.

Tác giả

DANH MỤC TỪ, CỤM TỪ VIẾT TẮT

DNA	: Deoxyribonucleic acid
RNA	: Ribonucleic acid
bp	: Cặp base (base pair)
CTAB	: Cetyltrimethyl amoniumbromide
dNTP	: Deoxynucleosid triphosphat
EDTA	: Ethylene diamin tetra acetate
EtBr	: Ethidium bromide
kb	: Kilo base
PCR	: Phản ứng chuỗi polymerase (Polymerase chain reaction)
Rnase	: Ribonuclease
TBE	: Tris base, Boric acid, EDTA.
TE	: Tris EDTA
MES	: 2-morpholinoethanesulfonic acid
PPT	: L- Phosphinothricin
AGPase	: ADP-Glucose pyrophosphorylase
MS	: Murashige and Skoog Medium
BSA	: bovine serum albumin fraxtion
BCIP/NBT	: 5 – Bromo – 4 – Chloro – 3 – idolyl phosphate, p- toluidine salt/Nitro Blue Tetrazolium
SDS	: sodium dodecyl sulfat

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1: Kết quả chọn lọc các cây chuyển gen trong môi trường chọn lọc.....	24
Bảng 2: Số dòng cây chuyển gen và số bản sao gen chuyển thu được từ mỗi dòng ngô.....	29
Bảng 3: Số lượng dòng cây chuyển gen theo các khoảng thời gian gây nhiễm khác nhau	30

DANH MỤC HÌNH

Hình 1: Một số enzyme quan trọng trong quá trình chuyển hóa sucrose thành tinh bột.	7
Hình 2: Cấu trúc chuyển gen pCambia2300-Ubi-Bt2;.....	15
Hình 3: Chuyển cấu trúc gen pCambia2300-Ubi-Bt2 vào mô phân sinh cây non một số dòng ngô.....	23
Hình 4: Kết quả tách DNA tổng số các dòng ngô sống sót sau chọn lọc cây chuyển gen.....	25
Hình 5: Kết quả kiểm tra sự có mặt của gen <i>Bt2</i> trong một số cây ngô chuyển gen bằng PCR với mỗi đặc hiệu.. ..	26
Hình 6: Kết quả kiểm tra sự có mặt của gen <i>Ubi</i> trong một số cây ngô chuyển gen bằng PCR với mỗi đặc hiệu.	27
Hình 7: Kết quả kiểm tra Southern một số dòng ngô chuyển gen;.....	28

MỤC LỤC

MỞ ĐẦU	1
1. Đặt vấn đề.....	1
2. Mục tiêu nghiên cứu đề tài.....	2
3. Nội dung nghiên cứu	2
CHƯƠNG I: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	3
1.1 Đại cương về cây ngô.....	3
1.2 Tinh bột và các gen điều khiển quá trình tổng hợp tinh bột.....	5
1.3 Các phương pháp chuyển gen thường sử dụng	7
1.3.1 Chuyển gen gián tiếp nhờ vi khuẩn <i>Agrobacterium tumerfaciens</i>	8
1.3.2 Chuyển gen trực tiếp	10
1.4 Tình hình nghiên cứu chuyển gen ở ngô	11
1.4.1 Các nghiên cứu chuyển gen trên thế giới	11
1.4.2 Các nghiên cứu chuyển gen trong nước	14
CHƯƠNG II: VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	15
2.1 Vật liệu và hóa chất nghiên cứu	15
2.1.1 Vật liệu	15
2.1.2 Hóa chất.....	16
2.2.2 Đánh giá các cây chuyển gen bằng PCR.....	19
2.2.3 Đánh giá các cây chuyển gen bằng lai Southern.....	20
CHƯƠNG III: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	23
3.1 Chọn lọc các dòng ngô chuyển gen.....	23
3.2 Đánh giá các cây chuyển gen bằng PCR.....	25
3.3 Đánh giá các cây chuyển gen bằng lai Southern	28
CHƯƠNG IV: KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	32
4.1 Kết luận.....	32

MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Ngô là cây lương thực đứng thứ hai trên thế giới sau lúa. Nó đóng vai trò quan trọng đối với đời sống con người. Không chỉ cung cấp lương thực cho con người, ngô còn đóng vai trò xóa đói giảm nghèo ở nhiều vùng kinh tế của nước ta. Hiện nay dân số đang tăng cao dẫn đến áp lực về lương thực càng trở nên nóng hơn bao giờ hết. Việc tăng năng suất cây trồng đặc biệt là các cây lương thực như ngô, lúa, lúa mì ... đang là thách thức đối với các nhà chọn tạo giống cây trồng. Hiện nay có hai phương pháp chủ yếu để tăng năng suất cây trồng đó là cải tiến phương thức canh tác và sử dụng giống mới dựa vào nỗ lực của các nhà chọn giống. Cho đến nay, các nhà chọn giống thường nghiên cứu tạo giống mới theo các hướng như: nghiên cứu đa dạng di truyền nguồn gen, di truyền phân tử các tính trạng quan tâm, chọn lọc nhờ chỉ thị phân tử và công nghệ gen. Cây ngô là cây trồng thu hạt nên tăng năng suất cây chủ yếu phụ thuộc vào các yếu tố như: chiều dài bắp, số lượng hạt, khối lượng của hạt... Để ứng dụng công nghệ gen vào việc tăng năng suất cây ngô chúng ta cần nghiên cứu các quá trình liên quan năng suất cây ngô như: quá trình quang hợp, quá trình tổng hợp tinh bột, hoạt động của các gen điều khiển quá trình tổng hợp sinh khối...

Nhiều nghiên cứu hóa sinh và phân tử đã làm sáng tỏ vai trò của các enzyme trong quá trình tổng hợp tinh bột. Các nghiên cứu cho thấy ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase) là enzyme đóng vai trò chìa khóa trong quá trình điều khiển tổng hợp tinh bột ở hạt ngũ cốc. Enzyme AGPase có cấu trúc tứ phân gồm 2 tiểu phần nhỏ được mã hóa bởi gen *Brittle 2 (Bt2)* và 2 tiểu phần lớn được mã hóa bởi gen *Shrunken 2 (Sh2)*. Chuyển gen *Sh2* và *Bt2* vào ngô là một trong những hướng nghiên cứu nhằm tăng khả năng tổng hợp tinh bột, tăng năng suất cây trồng.

Ứng dụng công nghệ gen chúng tôi tiến hành nghiên cứu: **Chuyển gen *Bt2* vào một số dòng ngô trồng bằng sử dụng mô phân sinh và *Agrobacterium tumefaciens*.**