

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



LUẬN VĂN THẠC SĨ

Chuyên ngành: Sinh học thực nghiệm

Mã số: 60420114

**NGHIÊN CỨU TẠO CÁC DÒNG NGÔ MANG GEN
ISOPENTENYL TRANSFERASE (*IPT*) BẰNG PHƯƠNG PHÁP BIẾN
NẠP NHỜ VI KHUẨN *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS***

Người hướng dẫn: **PGS. TS. Nguyễn Văn Đồng**

Học viên : **Trần Duy Hưng**

Hà Nội – 2015

Lời cảm ơn

Để hoàn thành bản luận văn này, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới PGS.TS. Nguyễn Văn Đồng đã tận tình, dìu dắt, hướng dẫn, truyền đạt những kinh nghiệm quý báu cũng như động viên và tạo mọi điều kiện giúp đỡ tôi trong quá trình học tập và nghiên cứu.

Tôi xin gửi lời cảm ơn đến phòng đào tạo đã tạo điều kiện và tận tình hướng dẫn mọi thủ tục để tôi có thể hoàn thành luận văn này

Tôi xin gửi lời cảm ơn tới tập thể cán bộ Phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ tế bào Thực vật - Viện Di truyền Nông nghiệp đã giúp đỡ nhiệt tình trong suốt thời gian tôi thực hiện khóa luận.

Cuối cùng nhưng không kém phần quan trọng, tôi xin gửi tới bố mẹ, anh chị cùng bạn bè, những người đã luôn quan tâm, ủng hộ và là chỗ dựa cho tôi trong suốt thời gian làm khóa luận này, cũng như trong cuộc sống.

Tôi luôn ghi nhớ và không bao giờ quên sự giúp đỡ vô cùng to lớn đó. Tôi xin gửi đến tất cả quý thầy cô, gia đình, bạn bè lòng biết ơn vô tận

Hà Nội, ngày 24 tháng 12 năm 2015

Học viên

Trần Duy Hưng

Mục lục

Lời cảm ơn	i
Mục lục.....	ii
Danh mục hình vẽ	iv
Danh mục bảng.....	v
Danh mục các chữ viết tắt	vi
MỞ ĐẦU	1
Chương 1 –TỔNG QUAN	3
1.1 Nguồn gốc cây ngô.....	3
1.2 Tình hình nghiên cứu ngô trên thế giới.....	5
1.3 Tình hình nghiên cứu ngô ở Việt Nam:.....	9
1.4 Cơ sở khoa học về nghiên cứu nạp gen vào thực vật bằng phương pháp <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	13
1.4.1 Ti-Plasmid.....	14
1.4.2 Chức năng của T-DNA	16
1.4.3 Cơ chế chuyển gen bằng <i>A. tumefaciens</i>	16
1.4.4 Gen chỉ thị - gen chọn lọc và cơ chế hoạt động chọn lọc của hygromycin	18
1.5 Cơ chế chịu hạn, hiện tượng già hóa và gen <i>IPT</i>	19
1.5.1 Cơ chế chịu hạn của thực vật	19
1.5.2 Hiện tượng già hóa và các yếu tố ảnh hưởng.....	20
1.5.3 Điều hòa sự già hóa và vai trò của Cytokinin	20
1.5.4 Gen <i>ipt</i> và promoter <i>pSARK12</i>	21
1.6 Các phương pháp kiểm tra sự có mặt và biểu hiện của gen biến nạp	21
1.6.1 Phương pháp Southern blot	21
1.6.2 Kiểm tra khả năng chịu hạn ở thời kỳ cây con	22
Chương 2 – VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP	24
2.1 Vật liệu	24
2.1.1 Vật liệu thực vật	24
2.1.2 Chủng vi khuẩn và vector dùng trong chuyển gen	24
2.1.3 Hóa chất và thiết bị sử dụng.....	24
2.2 Phương pháp nghiên cứu.....	25
2.2.1 Quy trình chuyển gen vào phiên non thông qua vi khuẩn <i>Agrobacterium</i> <i>tumefaciens</i>	25

2.2.2	Phân tích cây chuyển gen bằng phương pháp sinh học phân tử.....	27
2.2.3	Đánh giá khả năng chịu hạn của các dòng ngô chuyển gen ở thời kỳ cây con.	30
2.2.4	Đánh giá sự hóa già của lá trong điều kiện bị cắt khỏi cành.....	31
2.3	Địa điểm, thời gian và phương pháp xử lý số liệu	31
Chương 3- KẾT QUẢ		32
3.1	Kết quả của quá trình chuyển gen, chọn lọc và tái sinh của ba giống ngô.....	32
3.2	Kiểm tra bằng phương pháp sinh học phân tử.....	35
3.2.1	Kết quả tách chiết DNA tổng số.....	35
3.2.2	Kết quả phân tích cây chuyển gen bằng phương pháp PCR gen <i>hpt</i>	36
3.2.3	Kết quả phân tích cây chuyển gen bằng phương pháp PCR gen <i>ipt</i>	37
3.2.4	Kết quả phân tích Southern blot các dòng ngô chuyển gen thế hệ T1	38
3.3	Kết quả đánh giá khả năng chịu hạn của các dòng ngô chuyển gen ở thời kỳ cây con	40
3.4	Kết quả đánh giá quá trình hóa già của lá khi bị cắt lia.....	45
Chương 4 – THẢO LUẬN		46
4.1	Chuyển gen thông qua vi khuẩn	46
4.2	Phân tích bằng phương pháp sinh học phân tử.....	47
4.3	Đánh giá sơ bộ biểu hiện chịu hạn của cây con ở điều kiện phòng thí nghiệm.....	49
Chương 5 – KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ		52
5.1	Kết luận.....	52
5.2	Kiến nghị.....	52
TÀI LIỆU THAM KHẢO		53
PHỤ LỤC		59

Danh mục hình vẽ

Hình 1: Cấu trúc Ti-plasmid	14
Hình 2 : Hệ thống vector liên hợp.....	15
Hình 3 : Hệ thống vector nhị thể (kép)	15
Hình 4: Cấu trúc T-DNA	16
Hình 5 : Sơ đồ cấu trúc vector pSIChyg-2	24
Hình 6 : Sơ đồ quy trình chuyển gen	27
Hình 7: Khả năng phục hồi- tiếp nhận- tái sinh của các giống ngô	32
Hình 8: Tần số chuyển gen giả định.....	33
Hình 9: Một số hình ảnh các giai đoạn chuyển gen	33
Hình 10: Kết quả điện di DNA tổng số.....	36
Hình 11: Kết quả phân tích PCR gen <i>hpt</i> thế hệ T0.....	37
Hình 12: Kết quả phân tích PCR gen <i>ipt</i> thế hệ T0.....	37
Hình 13: Kết quả phân tích PCR gen <i>ipt</i> thế hệ T1.....	38
Hình 14: Kết quả Southern blot các dòng chuyển gen ở thế hệ T1	39
Hình 15: Đánh giá khả năng chịu hạn ở giai đoạn cây con ở nhà lưới số 1 & rễ của các cây xử lý hạn.....	40
Hình 16: Kết quả đánh giá khả năng chịu hạn giai đoạn cây con căn cứ vào chiều cao thân lá và chiều dài rễ dài nhất tại nhà lưới số 1.....	41
Hình 17: Kết quả đánh giá khả năng chịu hạn giai đoạn cây con căn cứ vào trọng lượng tươi tại nhà lưới số 1.....	41
Hình 18: Kết quả đánh giá khả năng chịu hạn giai đoạn cây con căn cứ vào trọng lượng khô tại nhà lưới số 1.....	41
Hình 19: Đánh giá khả năng chịu hạn ở giai đoạn cây con ở nhà lưới số 2 & rễ của các cây xử lý hạn.....	43
Hình 20: Kết quả đánh giá khả năng chịu hạn giai đoạn cây con căn cứ vào chiều cao thân lá và chiều dài rễ dài nhất tại nhà lưới số 2.....	43
Hình 21: Kết quả đánh giá khả năng chịu hạn giai đoạn cây con căn cứ vào trọng lượng tươi tại nhà lưới số 2.....	44
Hình 22: Kết quả đánh giá khả năng chịu hạn giai đoạn cây con căn cứ vào trọng lượng khô tại nhà lưới số 2.....	44
Hình 23: Đánh giá quá trình hóa già của lá CH9	45
Hình 24: Đánh giá quá trình hóa già của lá CM8.....	45

Danh mục bảng

Bảng 1: Phân loại thực vật	3
Bảng 2: Tình hình sản xuất ngô trên thế giới những năm gần đây	5
Bảng 3: Tình hình sản xuất ngô ở Việt Nam những năm gần đây	10
Bảng 4: Thành phần dinh dưỡng trong 100g hạt	11
Bảng 5: Trình tự môi.....	29
Bảng 6: Kết quả tổng hợp thí nghiệm chuyển gen chịu hạn	32
Bảng 7: Số copy gen chuyển.....	39

Danh mục các chữ viết tắt

WW	Điều kiện tưới nước đầy đủ
WS	Điều kiện xử lý hạn
SH	Chiều cao thân lá
LRL	Chiều dài rễ dài nhất
FWS	Trọng lượng tươi thân lá
FWR	Trọng lượng tươi rễ
DWS	Trọng lượng khô thân lá
DWR	Trọng lượng khô rễ
IM	Môi trường lây nhiễm
CCM	Môi trường đồng nuôi cấy
REM	Môi trường nuôi phục hồi
ECM	Môi trường chọn lọc mô sẹo
SeM	Môi trường phát sinh chồi
RM	Môi trường ra rễ

MỞ ĐẦU

Cây ngô là cây lương thực quan trọng cho nền kinh tế toàn cầu, là một trong năm cây lương thực chính của thế giới. Sản phẩm từ ngô ngoài là thực phẩm nuôi sống con người cũng như động vật ra có thể được ứng dụng trong nhiều ngành như dược phẩm. Ở các nước Trung Mỹ, Nam Á và Châu Phi, người ta sử dụng ngô làm lương thực chính cho người với phương thức rất đa dạng theo vùng địa lý và tập quán mỗi nơi. Ngô là cây lương thực giúp nhiều nơi giải quyết nạn đói trong đó có Việt Nam. Sản phẩm từ ngô ngoài là thực phẩm nuôi sống con người cũng như động vật ra có thể được ứng dụng trong ngành khác như dược phẩm. Gần đây thân ngô ngoài việc sử dụng làm chất đốt còn là nguyên liệu tiềm năng để chế tạo xăng sinh học.

Sản lượng ngô hàng năm bị giảm sút đáng kể bởi rất nhiều nhân tố sinh vật (biotic) cũng như phi sinh (abiotic). Trong đó hạn hán là nguyên nhân phi sinh quan trọng nhất khiến sản lượng ngô mất mát lên đến hơn 70%. Đất khô cằn cộng với lượng nước mưa phân bố không đều dẫn tới kết quả thu hoạch chỉ còn 1,3 tấn/ha giảm đáng kể so với tiềm năng thu được hơn 10 tấn/ha [64]. Chính sự khô cằn đã là tăng tốc quá trình lão hóa của lá, suy giảm khả năng quang hợp dẫn đến giảm sút sản lượng [84].

Cytokinin có vai trò thiết yếu đến nhiều quá trình tăng trưởng và phát triển của thực vật đặc biệt trong sự phân chia tế bào [68]. Trong công nghệ nuôi cấy mô tế bào *in vitro*, cytokinin có vai trò rõ ràng trong việc giúp mô lá tách rời chậm thoái hóa diệp lục tố. Ngay cả trong thực tiễn thì việc xử lý cytokinin cũng mang ý nghĩa thương mại rất lớn vì cytokinin giúp duy trì sự xanh tươi lâu hơn của rau sau thu hoạch và kéo dài tuổi thọ của hoa sau khi cắt khỏi cây [45].

Trong khi những phương pháp canh tác truyền thống đã có những thành công nhất định trong việc tạo ra những giống cây chịu hạn, thì việc bổ sung về kỹ thuật công nghệ sinh học vào việc tạo cây chuyển gen thích ứng được với hạn hán cũng đã bước đầu chứng minh được kết quả của mình. Đã có những nghiên cứu về biến nạp gen *ipt-* mã hóa enzyme isopentenyl transferase liên quan đến sinh tổng hợp

cytokinin isopentenyl adenine, zeatin và dihydrozeatin vào một số cây trồng. Kết quả cho thấy các trường hợp như: lúa- *Oryza sativa* [41], súp lơ- *Brassica oleracea* [72] và xà lách- *Lactuca sativa L. cv Evola* [65], thuốc lá [84], bông [58], lạc [78] và ngô [85] đều đạt những thành công nhất định. Nhằm bước đầu tạo ra giống ngô có khả năng chịu hạn, chúng tôi tiến hành đề tài “**Nghiên cứu tạo các dòng ngô mang gen isopentenyl transferase (*ipt*) bằng phương pháp biến nạp nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens***” với mục tiêu:

- Biến nạp thành công gen *ipt* vào một số dòng ngô chọn lọc
- Kiểm tra sự có mặt của gen *ipt* bằng kỹ thuật sinh học phân tử
- Bước đầu đánh giá khả năng chịu hạn ở cây con thế hệ T1

Chương 1 –TỔNG QUAN

1.1 Nguồn gốc cây ngô

Ngô hay bắp có tên khoa học là *Zea mays L.* Trong tiếng Anh từ “maize” bắt nguồn từ tiếng Tây Ban Nha (maíz) (“Maize”- Oxford English Dictionary online edition). Từ “corn” thường hay sử dụng hiện nay là cách gọi rút gọn của “Indian corn” có nghĩa là “cây lương thực của người Anh diêng” (“Maize”-Oxford English Dictionary online edition.).

Bảng 1: Phân loại thực vật

Giới (<i>kingdom</i>):	Plantae
(không phân hạng):	Angiosperms
(không phân hạng):	Monocots
(không phân hạng):	Commelinids
Bộ (<i>order</i>):	Poales
Họ (<i>family</i>):	Poaceae
Chi (<i>genus</i>):	<i>Zea</i>
Loài (<i>species</i>):	<i>Z. mays</i>

Có nhiều giả thuyết được đưa ra về nguồn gốc của ngô trong đó nổi lên 4 nhận định: 1.Sự thuần hóa trực tiếp từ cỏ teosinte 2.Nguồn gốc từ cây lai giữa ngô thuần hóa và cỏ teosinte 3.Trái qua hai hay nhiều quá trình thuần hóa của cả ngô hoang dại và teosinte 4.Tiến hóa từ cây lai của *Z. diploperennis* thuộc loài *Tripsacum* [73, 102]. Những nghiên cứu về di truyền học gần đây cho rằng quá trình thuần hóa ngô diễn ra vào khoảng năm 7000 TCN tại miền trung Mexico và tổ tiên của nó là loại cỏ teosinte hoang dại gần giống nhất với ngô ngày nay vẫn còn mọc trong lưu vực sông Balsas [36]. George Beadle vào năm 1939 đã chia sẻ quan điểm này trong nghiên cứu của mình về nguồn gốc cây ngô [27]. Trước đó vào năm 1926 Vavilop cũng đã chứng minh miền trung nam Mexico là trung tâm phát sinh thứ nhất và