

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

VŨ THỊ NHƯ TRANG

NGHIÊN CỨU BIỂU HIỆN GEN *GmCHI* LIÊN QUAN ĐẾN
TỔNG HỢP FLAVONOID VÀ CẢM ỨNG TẠO RỄ TƠ Ở
CÂY THỎ NHÂN SÂM (*TALINUM PANICULATUM*)

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

THÁI NGUYÊN, 2019

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

VŨ THỊ NHƯ TRANG

NGHIÊN CỨU BIỂU HIỆN GEN *GmCHI* LIÊN QUAN ĐẾN
TỔNG HỢP FLAVONOID VÀ CẢM ỨNG TẠO RỄ TƠ Ở
CÂY THỔ NHÂN SÂM (*TALINUM PANICULATUM*)

Ngành: Di truyền học

Mã số: 9420121

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

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

THÁI NGUYÊN, 2019

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu của tôi dưới sự hướng dẫn của GS.TS. Chu Hoàng Mậu. Các kết quả trình bày trong luận án là trung thực, một phần đã được công bố trong các tạp chí khoa học chuyên ngành với sự đồng ý và cho phép của các đồng tác giả; phần còn lại chưa ai công bố trong bất kỳ công trình nào khác. Mọi trích dẫn đều ghi rõ nguồn gốc.

Tôi xin chịu trách nhiệm hoàn toàn về nội dung và các số liệu đã trình bày trong luận án.

Thái Nguyên, tháng 5 năm 2019

TÁC GIẢ

Vũ Thị Như Trang

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc nhất tới GS.TS. Chu Hoàng Mậu đã trực tiếp hướng dẫn và thường xuyên chia sẻ, động viên khích lệ để tôi có được sự tự tin và lòng đam mê khoa học giúp tôi hoàn thành bản luận án này.

Tôi xin chân thành cảm ơn PGS.TS. Lê Văn Sơn và các cán bộ, nghiên cứu viên 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 một số thí nghiệm nghiên cứu thuộc đề tài luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn sự giúp đỡ của thầy cô 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. Được học tập và sinh hoạt chuyên môn tại tập thể khoa học nghiêm túc, tôi đã nhận được nhiều góp ý quý báu, được trang bị thêm những phương pháp nghiên cứu và có những hiểu biết sâu sắc hơn về các vấn đề của Sinh học hiện đại.

Tôi xin cảm ơn các thầy cô và cán bộ Khoa Sinh học, các thầy cô và cán bộ Bộ phận đào tạo Sau đại học, Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên đã giúp đỡ và tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi hoàn thành khoá học này.

Cuối cùng, tôi xin tỏ lòng tri ân đối với những người thầy, những đồng nghiệp, gia đình và bạn bè là những điểm tựa tinh thần vững chắc, đã giúp đỡ, động viên, khích lệ, chia sẻ những khó khăn và luôn đồng hành cùng tôi trong quá trình học tập của mình.

Thái Nguyên, tháng 5 năm 2019

TÁC GIẢ

Vũ Thị Như Trang

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN	i
LỜI CẢM ƠN	ii
MỤC LỤC.....	iii
DANH MỤC KÍ HIỆU, CÁC TỪ VÀ CHỮ VIẾT TẮT	v
DANH MỤC CÁC BẢNG.....	viii
DANH MỤC CÁC HÌNH.....	ix
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 của đề tài luận án	4
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	5
1.1. CÂY THỔ NHÂN SÂM.....	5
1.1.1. Phân loại và đặc điểm sinh học của cây Thổ nhân sâm.....	5
1.1.2. Thành phần hóa học cây Thổ nhân sâm.....	6
1.1.3. Nghiên cứu định danh cây Thổ nhân sâm.....	7
1.2. FLAVONOID VÀ TỔNG HỢP FLAVONOID Ở THỰC VẬT.....	9
1.2.1. Flavonoid	9
1.2.2. Con đường tổng hợp flavonoid ở thực vật.....	16
1.2.3. Enzyme CHI và biểu hiện gen mã hóa CHI.....	21
1.3. NGHIÊN CỨU NUÔI CÂY <i>IN VITRO</i> Ở CÂY THỔ NHÂN SÂM	28
1.3.1. Tái sinh <i>in vitro</i> ở cây Thổ nhân sâm	28
1.3.2. Nuôi cấy rễ tơ ở cây Thổ nhân sâm	34
Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	42
2.1. VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU	42
2.1.1. Vật liệu thực vật.....	42
2.1.2. Chủng vi khuẩn và các loại vector.....	43
2.2. HÓA CHẤT, THIẾT BỊ VÀ ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU	43

2.2.1. Hóa chất, thiết bị nghiên cứu	43
2.2.2. Địa điểm nghiên cứu	44
2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	45
2.3.1. Phương pháp định danh mẫu cây Thổ nhân sâm	46
2.3.2. Các phương pháp nuôi cấy <i>in vitro</i>	47
2.3.3. Phương pháp chuyển gen <i>GmCHI</i> ở cây Thổ nhân sâm.....	52
2.3.4. Phương pháp phân tích cây chuyển gen	54
2.3.5. Các phương pháp phân tích, xử lý số liệu.....	57
Chương 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN	58
3.1. KẾT QUẢ ĐỊNH DANH CÁC MẪU THỔ NHÂN SÂM.....	58
3.1.1. Đặc điểm hình thái các mẫu Thổ nhân sâm thu ở một số địa phương. 58	
3.1.2. Đặc điểm trình tự nucleotide của vùng <i>ITS</i> và đoạn gen <i>matK</i>	60
3.1.3. Thảo luận kết quả định danh mẫu Thổ nhân sâm trong tự nhiên	66
3.2. TẠO DÒNG THỔ NHÂN SÂM CHUYỂN GEN <i>GmCHI</i>	67
3.2.1. Nghiên cứu hệ thống tái sinh <i>in vitro</i> phục vụ chuyển gen ở cây Thổ nhân sâm	67
3.2.2. Kết quả chuyển gen <i>GmCHI</i> và tạo cây Thổ nhân sâm chuyển gen....	76
3.2.3. Kết quả phân tích cây Thổ nhân sâm chuyển gen.....	81
3.2.4. Thảo luận kết quả tạo dòng Thổ nhân sâm chuyển gen <i>GmCHI</i>	87
3.3. TẠO DÒNG RỄ TƠ TỪ CÂY THỔ NHÂN SÂM	90
3.3.1. Kết quả tạo dòng rễ tơ từ cây Thổ nhân sâm	90
3.3.2. Thảo luận kết quả tạo dòng rễ tơ từ cây Thổ nhân sâm.....	98
KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ.....	100
1. Kết luận	100
2. Đề nghị.....	100
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	104
PHỤ LỤC.....	118

DANH MỤC KÍ HIỆU, CÁC TỪ VÀ CHỮ VIẾT TẮT

Kí hiệu, viết tắt	Tiếng Anh	Nghĩa tiếng Việt
AS	Acetosyringone	
BAP	Benzylaminopurine	
bp	base pairs	Cặp bazơ nito
CCM	Co-cultivation medium	Môi trường đồng nuôi cấy
cDNA	Complementary	DNA bổ sung
CHI	Chalcone isomerase	
C4H	Cinnamate 4-hydroxylase	
CHS	Chalcone synthase	
4CL	4-Coumarate CoA ligase	
cs		Cộng sự
CTAB	Cetyltrimethyl ammonium bromide	
2,4 D	2,4-Dichlorophenoxyacetic acid	
DFR	Dihydroxyflavonol 4- reductase	
DNA	Deoxyribonucleic acid	
dNTP	Deoxynucleoside triphosphate	
FAP	Fatty-acid-binding proteins	
F3H	Flavanone-3-hydroxylase	
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay	Xét nghiệm ELISA
FLS	Flavonol synthase	
FNS II	Flavone synthase II	
GA ₃	Gibberellic acid	Axit gibberellic
GM	Germination medium	Môi trường nảy mầm

Kí hiệu, viết tắt	Tiếng Anh	Nghĩa tiếng Việt
<i>GmCHI</i>	<i>Glycine max</i> chalcone isomerase	Gen <i>GmCHI</i> phân lập từ cây đậu tương
IAA	Idole acetic acid	Axit idole acetic
IBA	Idolbutylic acid	Axit idolbutylic
IFS	Isoflavone synthase	
ITS	Internal transcribed spacers	
Kb	Kilo base	
kDa	Kilo Dalton	
LB	Luria Bertani	Môi trường dinh dưỡng cơ bản nuôi cấy vi khuẩn
LDOX	Leucoanthocyanidin oxygenase	
L-Tyr	L-tyrosine	Axit amin L-tyrosine
mRNA	Messenger ribonucleic acid	RNA thông tin
MS	Murashige và Skoog, 1962	Môi trường dinh dưỡng cơ bản nuôi cấy mô thực vật
NAA	Naphthaleneacetic acid	Axit naphthaleneacetic
OD	Optical density	Mật độ quang
Ori	Origin	Điểm khởi đầu sao chép
PAL	Phenylalanine ammonia-lyase	
PCR	Polymerase chain reaction	Phản ứng chuỗi polymerase
Ri-plasmid	Root inducing- plasmid	
RM	Rooting medium	Môi trường tạo rễ
RNA	Ribonucleic acid	Axit ribonucleic
Rol	Root locus	Gen rol
rpm	Revolutions per minute	Số vòng/ phút
scFv	Single-chain variable fragment	
SDS	Sodium dodecyl sulfate	
SEM	Shoot elongation medium	Môi trường kéo dài chồi

Kí hiệu, viết tắt	Tiếng Anh	Nghĩa tiếng Việt
SIM	Shoot induction medium	Môi trường cảm ứng tạo chồi
Taq DNA polymerase	<i>Thermus aquaticus</i> DNA polymerase	
T-DNA	Transfer DNA	Đoạn DNA được chuyển vào thực vật
TDZ	Thidiazuron	
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
TL-DNA	Transfer left -DNA	Vùng biên trái đoạn DNA được chuyển vào thực vật
TR-DNA	Transfer right -DNA	Vùng biên phải đoạn DNA được chuyển vào thực vật
UV	Ultraviolet	Tia cực tím
<i>Vir</i>	<i>Virus interferon resistance</i>	Gen <i>vir</i>
vvm	Volume volume minute	Thể tích khí/thể tích chất lỏng/ phút
WPM	Woody plant medium	Môi trường dinh dưỡng cơ bản nuôi cây cây thân gỗ
WT	Wild type	Cây không chuyển gen
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galacto-pyranoside	
ZT	Zeatin	

DANH MỤC CÁC BẢNG

Bảng 2.1. Thống kê các trình tự môi sử dụng trong nghiên cứu.....	44
Bảng 3.1. Sự sai khác về trình tự nucleotide của vùng <i>ITS</i> phân lập từ 5 mẫu Thổ nhân sâm so với <i>T. paniculatum</i> , mã số <i>EU410357</i>	62
Bảng 3.2. Sự sai khác về trình tự nucleotide của đoạn gen <i>matK</i> phân lập từ 5 mẫu Thổ nhân sâm so với <i>T. paniculatum</i> , mã số <i>AY015274</i>	64
Bảng 3.3. Ảnh hưởng của javel 60 % và HgCl ₂ 0,1 % đến tỷ lệ nảy mầm của hạt.....	688
Bảng 3.4. Ảnh hưởng của BAP đến sự phát sinh và sinh trưởng chồi từ lá mầm	70
Bảng 3.5. Ảnh hưởng của BAP đến sự phát sinh và sinh trưởng chồi từ đoạn thân mang mắt chồi bên	71
Bảng 3.6. Ảnh hưởng của tổ hợp 2 mg/l BAP và IBA đến sự phát sinh, sinh trưởng chồi từ đoạn thân mang mắt chồi bên	73
Bảng 3.7. Ảnh hưởng của IAA đến khả năng ra rễ của cây Thổ nhân sâm	74
Bảng 3.8. Ảnh hưởng của NAA đến khả năng ra rễ của cây Thổ nhân sâm	75
Bảng 3.9. Hiệu quả tạo đa chồi từ lá mầm và đoạn thân mang mắt chồi bên sau khi lây nhiễm <i>A. tumefaciens</i>	77
Bảng 3.10. Kết quả biến nạp cấu trúc mang gen <i>GmCHI</i> vào cây Thổ nhân sâm...	79
Bảng 3.11. Hàm lượng flavonoid tổng số của hai dòng Thổ nhân sâm chuyển gen T1- 2.2; T1- 10 và cây đối chứng không chuyển gen	87
Bảng 3.12. Kết quả khảo sát vật liệu thích hợp tạo rễ tơ ở cây Thổ nhân sâm....	90
Bảng 3.13. Ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn <i>A. rhizogenes</i> , nồng độ AS, thời gian nhiễm khuẩn, thời gian đồng nuôi cây đến hiệu quả chuyển gen tạo rễ tơ từ mô lá Thổ nhân sâm.....	93
Bảng 3.14. Xác định ngưỡng diệt khuẩn của cefotaxime sau 4 tuần	94
Bảng 3.15. Ảnh hưởng của trạng thái môi trường đến sự tăng trưởng rễ tơ Thổ nhân sâm.....	96