

**ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC**

TRẦN THỊ THANH VÂN

**NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM CỦA GEN MÃ HÓA CHALCONE
ISOMERASE PHÂN LẬP TỪ CÂY ĐẬU TƯƠNG**

LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Thái Nguyên - 2016

**ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC**

TRẦN THỊ THANH VÂN

**NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM CỦA GEN MÃ HÓA CHALCONE
ISOMERASE PHÂN LẬP TỪ CÂY ĐẬU TƯƠNG**

Chuyên ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 60.42.02.01

LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

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

Thái Nguyên - 2016

MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Đậu tương (*Glycine max* (L.) Merrill) thuộc cây họ đậu (Fabaceae), là cây trồng quan trọng không chỉ ở Việt Nam và còn xuất hiện ở gần 200 quốc gia trên thế giới. Đậu tương là cây trồng cạn ngắn ngày, có giá trị dinh dưỡng và giá trị kinh tế cao. Đối với nông nghiệp, đậu tương là cây trồng thân thiện với môi trường và thúc đẩy phát triển kinh tế nông nghiệp. Đậu tương được ví như nhà máy sản xuất đạm tự nhiên nhờ các nốt sần trong rễ cây giúp cải thiện chất lượng đất thông qua khả năng hấp thụ nitơ tự nhiên.

Các sản phẩm từ đậu tương đã và đang được sử dụng rộng rãi trên toàn thế giới. Nhiều nghiên cứu cho thấy đậu tương tốt cho sức khỏe con người nhờ có chứa thành phần isoflavone. Isoflavone là dược chất có nguồn gốc thảo mộc, có thể làm giảm sự xuất hiện của một số loại ung thư, giảm các triệu chứng mãn kinh, ngăn ngừa các bệnh về tim mạch, béo phì, loãng xương, ngăn chặn sự gia tăng cholesterol trong máu. Bên cạnh đó isoflavone giúp phụ nữ tăng cường chất lượng của da, giảm được các nếp nhăn, giảm độ sâu của nếp nhăn mắt, làm cho da săn chắc hơn nhờ tăng cường kết nối collagen, đồng thời cải thiện màu sắc và giữ ẩm cho da.

Con đường sinh tổng hợp isoflavone ở đậu tương được biết là một nhánh của con đường phenylpropanoid với hai enzyme chìa khóa là chalcone synthase (CHI) và isoflavone synthase (IFS) để tổng hợp isoflavone genistein và daidzein có khả năng chống oxy hóa mạnh nhất. Chúng được tìm thấy chủ yếu ở đậu tương và các loại cây họ đậu khác. Tuy nhiên, hàm lượng isoflavone trong đậu tương rất thấp, khoảng từ 50 – 3000 $\mu\text{g/g}$ và tồn tại ở hai dạng chính là glycoside và aglucone. Dạng glycoside có trọng lượng phân tử lớn, chiếm tới trên 90% isoflavone tổng số được cho là hấp thụ hạn chế trong hệ tiêu hóa người, trong

khi đó, dạng aglucone được hấp thụ nhanh hơn, nhưng hàm lượng lại rất thấp, chỉ chiếm từ 1% – 5% isoflavone tổng số. Chính vì vậy nghiên cứu ứng dụng công nghệ gen vào việc cải thiện theo hướng nâng cao hàm lượng isoflavone trong hạt đậu tương là rất cần thiết. Kỹ thuật biểu hiện gen ở thực vật cho phép tạo ra các dòng cây có khả năng tổng hợp isoflavone với hàm lượng cao, tạo nguyên liệu phục vụ sản xuất các chế phẩm sinh học đáp ứng nhu cầu ngày càng tăng của công tác chăm sóc và bảo vệ sức khỏe con người ở nước ta

Xuất phát từ những lý do trên, đề tài luận văn thạc sĩ đã được chúng tôi lựa chọn và thực hiện là: “*Nghiên cứu đặc điểm của gen mã hóa chalcone isomerase phân lập từ cây đậu tương*”.

2. Mục tiêu nghiên cứu

Phân tích được đặc điểm của gen mã hóa chalcone synthase trong con đường sinh tổng hợp isoflavone phân lập từ hai giống đậu tương khác nhau về hàm lượng isoflavone.

3. Nội dung nghiên cứu

3.1. Phân tích hàm lượng isoflavone trong hạt nảy mầm của ba giống đậu tương Việt Nam là DT51, DT90 và DT84.

3.2. Nghiên cứu thông tin về gen mã hóa chalcone isomerase (CHI), thiết kế cặp mồi PCR nhân gen *CHI*, tách dòng và xác định trình tự gen *CHI*.

3.3. Phân tích sự đa dạng về trình tự nucleotide và trình tự amino acid suy diễn của gen *CHI*.

4. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đậu tương

Kết quả phân tích đặc điểm của gen *CHI* và xác định những điểm sai khác về trình tự nucleotide của gen *CHI* và trình tự amino acid suy diễn giữa các giống đậu tương khác nhau về hàm lượng daidzein và genistein là cơ sở để giải thích mối liên quan giữa gen *CHI* với hoạt động tổng hợp isoflavone ở đậu

tương. Đồng thời cũng là cơ sở sử dụng đoạn mã hóa của gen *CHI* trong việc thiết kế vector chuyển gen trong mục đích nâng cao hàm lượng isoflavone trong đậu tương bằng kỹ thuật chuyển gen.

Kết quả xác định hàm lượng daidzein và genistein của các giống đậu tương nghiên cứu cung cấp dữ liệu cho chọn giống đậu tương theo định hướng nâng cao hàm lượng isoflavone của đậu tương.

Kết quả nghiên cứu của luận văn là tư liệu khoa học phục vụ cho mục đích nghiên cứu và giảng dạy công nghệ sinh học.

Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. CÂY ĐẬU TƯƠNG

1.1.1. Nguồn gốc, phân loại và đặc điểm thực vật học của cây đậu tương

Cây đậu tương hay còn được gọi là cây đậu nành có tên khoa học là *Glycine max* (L.) Merrill, là loại cây ăn hạt, thân thảo thuộc họ đậu (*Fabaceae*), đậu tương mang bộ nhiễm sắc thể $2n=40$. Cây đậu tương được xếp trong hệ thống như sau:

Giới: *Plantae*

Ngành: *Magnoliophyta*

Lớp: *Magnoliopsida*

Bộ: *Fabales*

Họ: *Fabaceae*

Phân họ: *Faboideae*

Giống: *Glycine*

Loài: *Max*

Cây đậu tương xuất hiện đầu tiên từ 1100 năm trước Công nguyên tại vùng Đông Bắc Trung Quốc. Theo nhiều tài liệu đã được nghiên cứu thì cây đậu tương có nguồn gốc từ vùng Mãn Châu phía Bắc Trung Quốc từ thời các triều đại Phong kiến, sau đó có nhiều tài liệu cho rằng cây đậu tương được thuần hoá dưới triều đại Shang, hay còn gọi là triều đại nhà Thương, vào khoảng thế kỉ XVII đến thế kỉ XI trước Công Nguyên, sau đó lại được lan truyền sang Nhật Bản, Triều Tiên vào khoảng thế kỷ thứ VIII, và tiếp tục được lan truyền sang các nước châu Á khác như Thái Lan, Malaysia, Hàn Quốc, Việt Nam [1].

Đến thế kỷ XVII, cây đậu tương được giới thiệu vào Châu Âu bởi các nhà thực vật học và được đặt tên là *Glycine max*. Sau đó đến thế kỷ XVIII cây đậu tương mới được du nhập vào Mỹ, nhưng có nhiều kết quả cho thấy do có sự phù

hợp về điều kiện khí hậu và đất đai nên việc trồng trọt đậu tương tại Mỹ phát triển mạnh mẽ do đó đã cho sản lượng đậu tương tăng lên nhanh chóng, đến nay đậu tương vẫn được coi là cây trồng chính đem lại giá trị kinh tế cao tại Mỹ và nhiều quốc gia khác trên thế giới: Trung Quốc, Brazil... [3], [5].

Hiện nay, cây đậu tương vẫn đang là cây được trồng phổ biến ở nhiều quốc gia trên thế giới bởi đậu tương là cây công nghiệp, cây thực phẩm đem lại giá trị kinh tế cao nhờ sự vượt trội hơn hẳn so với các cây trồng khác bởi hàm lượng các chất dinh dưỡng như protein, lipid cao, chứa nhiều vitamin, các khoáng chất và nhiều hoạt chất thảo mộc có lợi cho sức khoẻ con người.

Tại Việt Nam đậu tương được ví như “vàng mọc từ đất” bởi đậu tương cho sản lượng cao, cải tạo đất và là cây trồng xen canh gối vụ với nhiều loại cây trồng, chứa nhiều hàm lượng protein đem lại nhiều giá trị kinh tế.

Cây đậu tương là loại cây thân thảo, bụi nhỏ và là cây hằng năm. Thân cây mảnh, cao khoảng từ 0,8m đến 0,9 m, có lông, cành hướng lên phía trên. Một cây đậu tương hoàn chỉnh bao gồm rễ, thân, lá, hoa, quả và hạt.

Rễ đậu tương

Rễ đậu tương là cây rễ cọc, bộ rễ bao gồm rễ cái (rễ chính) và nhiều rễ bên hay còn gọi là rễ phụ, trên rễ cái mọc ra nhiều rễ phụ là các rễ phụ cấp 2 và rễ phụ cấp 3. Trong điều kiện bình thường rễ cái ăn sâu vào đất khoảng 20-30 cm hoặc có khi ăn sâu đến 150cm; thông thường các rễ con tập trung nhiều nhất ở độ sâu 6-20cm. Bộ rễ phát triển và được chia thành 2 thời kỳ chính: (i) Thời kỳ thứ nhất: rễ cái và rễ phụ đầu tiên phát triển mạnh và sinh ra nhiều rễ con, thời kỳ này kéo dài từ 30-40 ngày sau mọc. (ii) Thời kỳ thứ hai: lớp rễ đầu tiên phát triển chậm dần, rễ con không phát triển chỉ có các rễ phụ nhỏ kéo dài ra và phát triển cho tới gần thu hoạch.

Trên rễ chính và rễ phụ có nhiều nốt sần chứa các vi khuẩn *Rhizobium japonicum* sinh sống, loại vi khuẩn này có dạng hình gậy hoặc hình cầu quan sát

được dưới kính hiển vi điện tử, vi khuẩn *Rhizobium japonicum* sống trong lòng đất, có khả năng cố định đạm từ khí trời, mỗi một cây họ đậu có vài trăm nốt sần phân bố đồng đều trên các rễ, ban đầu khi mới hình thành các nốt sần có màu sữa sau đó phát triển có màu hồng. Quá trình hình thành nốt sần kéo dài 16-21 ngày, phát triển nhiều mạnh nhất vào lúc đậu tương ra hoa và làm quả.

Giữa vi sinh vật nốt sần với cây đậu tương chúng có mối quan hệ cộng sinh, cây cung cấp chất dinh dưỡng cho vi khuẩn hoạt động và ngược lại vi khuẩn lại tích hợp nitơ tự do của không khí chuyển sang đạm hữu cơ để cây có thể sử dụng được. Cây đậu tương càng nhiều chất dinh dưỡng cho vi sinh vật hoạt động thì vi sinh vật càng phát triển và tích lũy đạm được càng nhiều cho cây sinh trưởng và phát triển tốt.

Thân, cành đậu tương

Thân cây đậu tương thuộc thân thảo có hình tròn, chia đốt, ít phân cành, trên thân có nhiều lông nhỏ. Thân đậu tương thường đứng hoặc có khi thân bò hay nửa bò, khi còn non thân có màu xanh hoặc tím, khi về già chuyển sang màu nâu nhạt, màu sắc của thân khi còn non có liên quan chặt chẽ với màu sắc của hoa sau này. Nếu thân lúc còn non có màu xanh thì hoa màu trắng và nếu khi cây còn non thân có màu tím thì hoa màu tím đỏ. Thân cao trung bình 0,5- 1,2 m hoặc cũng có khi cao nhất đến 1,5m, trên thân mang 14-15 lông, các lông ở phía dưới thường ngắn, các lông ở phía trên thường dài. Tùy theo giống và thời vụ gieo mà chiều dài lông có sự khác nhau thường biến động từ 3-10 cm. Cây đậu tương trong vụ hè có lông dài hơn vụ xuân và vụ đông. Chiều dài của lông góp phần quyết định chiều cao của thân. Thân cây đậu tương thường cao từ 0,3-1,0m. Giống đậu tương đại cao từ 2-3m. Thực tế cũng có những giống không có lông tơ. Những giống có mật độ lông tơ dày, màu sẫm có sức kháng bệnh, chịu hạn và chịu rét khỏe những giống không có lông tơ thường sinh trưởng không bình thường, sức chống chịu kém. Thân có lông tơ nhiều hay ít, dài hay ngắn, dày hay

thưa là một đặc điểm phân biệt các giống với nhau. Đốt đầu tiên của thân chính mang hai lá mầm, đốt thứ hai lại mang hai lá đơn mọc đối diện nhau, sau đó kể từ đốt thứ ba trở đi mỗi đốt mang một lá kép có các lá chét, các lá kép mọc đối diện nhau. Dựa vào sự sinh trưởng và đặc điểm mà thân có các loại như sau:

Loại mọc thẳng: thân cứng, đường kính thân lớn, thân cao trung bình, đốt ngắn, nhiều quả.

Loại bò: thân chính phân cành rất nhỏ, mềm, phủ trên bề mặt đất thành đám dây, thân dài, đốt dài, quả nhỏ.

Loại nửa bò: là loại trung gian giữa hai loại mọc thẳng và mọc bò.

Loại mọc leo: thân nhỏ rất dài, mọc bò dưới đất hay leo lên giá thể khác.

Thân đậu tương có khả năng phân cành ngay từ nách lá đơn hoặc kép. Dựa vào đặc tính sinh trưởng của thân cành và đặc điểm ra hoa nên có thể chia giống đậu tương ra làm hai loại:

Sinh trưởng hữu hạn: Khi ngọn thân hoặc ngọn cành đã ra hoa thì không tiếp tục sinh trưởng nữa hay cành không cao lên nữa, loại này chủ yếu được trồng lấy để lấy hạt.

Sinh trưởng vô hạn: Khi đậu tương ra hoa kết quả và cả khi sắp chín thân cành vẫn tiếp tục sinh trưởng, thường là loại mọc bò.

Từ lúc mọc đến khi cây có 5 lá thật (3 lá kép) khoảng 25 – 30 ngày sau khi gieo, thân sinh trưởng với tốc độ bình thường.

Khi cây đã có 6-7 lá thật thân bắt đầu phát triển mạnh. Điểm khác biệt của cây đậu tương với cây trồng khác là cây ra hoa rộ lại là lúc thân cành phát triển mạnh nhất. Đây là giai đoạn hai quá trình sinh trưởng, sinh dưỡng cho nên cần cung cấp đầy đủ dinh dưỡng tạo điều kiện cho bộ rễ phát triển thuận lợi.

Cành mọc ra từ đốt trên thân, hướng lên trên, số cành trên thân nhiều hay ít phụ thuộc vào loại giống đậu tương, đất đai, kỹ thuật canh tác, điều kiện gieo

trồng, có những giống đậu tương chỉ có 1-2 cành hoặc có những giống không có cành, cành và thân chính kết hợp với nhau tạo thành tán cây đậu tương [7], [15].

Lá đậu tương

Cây đậu tương có lá mọc cách và có 3 loại lá chính: lá mầm, lá đơn và lá kép có nhiều hình dạng khác nhau như hình trái xoan, trứng, tròn, dài, ô van, mũi lá gần nhọn, không đều ở gốc. Mặt lá thường có nhiều lông trắng.

Lá mầm (lá tứ diệp): lá mầm mới mọc có màu vàng hay xanh lục khi tiếp xúc với ánh sáng thì chuyển sang màu xanh. Hạt giống to thì lá mầm chứa nhiều dinh dưỡng nuôi cây mầm, khi hết chất dinh dưỡng lá mầm khô héo.

Lá nguyên (lá đơn): xuất hiện sau khi mọc từ 2-3 ngày và mọc phía trên lá mầm. Lá đơn mọc đối xứng nhau, lá đơn to xanh bóng là lá biểu hiện cây sinh trưởng tốt, lá đơn to xanh đậm biểu hiện của một giống có khả năng chịu rét, lá đơn nhọn gọn sóng là biểu hiện cây sinh trưởng không bình thường.

Lá kép: Mỗi lá kép có 3 lá chét, cũng có thể có 4-5 lá chét. Lá kép mọc so le, có màu xanh tươi, khi già biến thành màu vàng nâu. Cũng có giống khi quả chín lá vẫn giữ được màu xanh. Phần lớn lá có nhiều lông tơ. Lá có nhiều hình dạng khác nhau tùy theo giống. Những giống lá nhỏ và dài chịu hạn khỏe nhưng thường cho năng suất thấp, những giống lá to chịu hạn kém nhưng thường cho năng suất cao hơn. Nếu hai lá kép đầu to và dày thường biểu hiện giống có khả năng chống chịu rét. Số lượng lá kép nhiều hay ít, diện tích lá to hay nhỏ chi phối rất nhiều đến năng suất và phụ thuộc vào thời vụ gieo trồng. Các lá nằm cạnh chùm hoa nào giữ vai trò chủ yếu cung cấp dinh dưỡng cho chùm hoa ấy. Nếu vì điều kiện nào đó làm cho lá bị úa vàng thì quả ở vị trí đó thường bị rụng hoặc lép. Số lá nhiều to khỏe nhất vào thời kỳ đang ra hoa rộ. Khi phiến lá phát triển to, rộng, mỏng, phẳng, có màu xanh tươi là biểu hiện cây sinh trưởng khỏe có khả năng cho năng suất cao .