

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC



NGUYỄN PHƯƠNG THẢO

**ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG CHỊU HẠN VÀ PHÂN LẬP
GEN CYSTATIN Ở MỘT SỐ GIỐNG NGÔ
CHỊU HẠN KHÁC NHAU**

LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Thái Nguyên, năm 2012

MỞ ĐẦU

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ở Việt Nam, ngô là cây lương thực quan trọng được trồng ở nhiều vùng sinh thái khác nhau, đa dạng về mùa vụ gieo trồng và hệ thống canh tác [4]. Cây ngô không chỉ cung cấp lương thực cho người, vật nuôi mà còn là cây trồng xóa đói giảm nghèo tại các tỉnh có điều kiện kinh tế khó khăn. Tuy nhiên trong những năm qua, do hạn chế về điều kiện tưới tiêu, tập quán canh tác và đặc biệt là việc chọn giống chịu hạn đưa vào sản xuất chưa được chú trọng, thêm vào đó là diễn biến thời tiết phức tạp, hạn hán thường xuyên xảy ra nên năng suất ngô của nước ta vẫn còn thấp.

Nước ta có 75% diện tích là đồi núi, lượng mưa hàng năm không đồng đều giữa các vùng, do vậy tình trạng hạn hán thường xuyên diễn ra dẫn đến năng suất cây trồng nói chung và cây ngô nói riêng bị giảm. Năm 2004, tỉnh Đắk Lắk có trên 28000 ha ngô bị hạn, trong đó mất trắng 60% và giảm năng suất 40%. Để hạn chế ảnh hưởng của hạn tới năng suất ngô, trong những năm gần đây nước ta đã tuyển chọn và mở rộng trồng những giống ngô lai có khả năng chịu hạn tốt, cho năng suất cao. Ngoài ra, cũng có nhiều công trình nghiên cứu đến khả năng chịu hạn của cây ngô. Đó là kết quả đánh giá khả năng chịu hạn của cây ngô trên đồng ruộng [17], đánh giá khả năng chịu hạn của cây ngô non trong điều kiện hạn nhân tạo [11], [18]), nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường đến khả năng tạo mô sẹo của ngô [14]. Có một số công trình nghiên cứu về ngô đã tiếp cận phân tích các đại phân tử DNA như: phân lập gen dehydrin *dhn1/rab17* từ DNA genome [6]), phân lập gen dehydrin từ cDNA [25]). Những nghiên cứu ở mức độ phân tử nhằm mục đích tìm kiếm và phân tích gen liên quan đến đặc tính chịu hạn của cây ngô. Các nghiên cứu đều thống nhất rằng đặc tính chịu hạn của cây ngô nói riêng và cây trồng nói chung do nhiều gen quyết định, trong đó có gen cystatin.

Xuất phát từ nhu cầu thực tiễn của việc chọn tạo giống ngô theo hướng nâng cao khả năng chịu hạn, chúng tôi đã tiến hành đề tài nghiên cứu **“Đánh giá khả năng chịu hạn và phân lập gen cystatin ở một số giống ngô chịu hạn khác nhau”**.

2. MỤC TIÊU NGHIÊN CỨU

- Xác định được mức độ chịu hạn của một số giống ngô ở giai đoạn cây non.
- Xác định được mối liên quan giữa hoạt tính của enzyme α – amylase, protease, chiều dài rễ với khả năng chịu hạn của một số giống ngô.
- Phân lập và xác định được trình tự gen cystatin ở một số giống ngô có khả năng chịu hạn khác nhau.

3. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

- Đánh giá khả năng chịu hạn bằng phương pháp gây hạn nhân tạo ở giai đoạn 3, 5, 7, 9 ngày gây hạn.
- Xác định hoạt tính của α – amylase, protease trong hạt của 10 giống ngô nghiên cứu.
- Xác định chiều dài rễ 5 ngày tuổi ở giai đoạn cây non.
- Tách chiết DNA tổng số của 10 giống ngô nghiên cứu.
- Sử dụng kỹ thuật PCR để nhân gen cystatin ở một số giống ngô.
- Tách dòng gen cystatin ở 2 giống ngô: một giống chịu hạn tốt và một giống chịu hạn kém.
- Xác định trình tự gen cystatin ở giống ngô có khả năng chịu hạn kém.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. CÂY NGÔ

1.1.1. Nguồn gốc và phân loại

Cây ngô có tên khoa học là *Zea mays* L., là một loại cây lương thực thuộc chi *Maydeae*, họ hòa thảo (Gramineae), bộ hòa thảo (Graminales).

Căn cứ vào kết quả nghiên cứu khảo cổ học, tế bào học, di truyền học... cho thấy cây ngô có nguồn gốc từ Châu Mỹ, ngô lan truyền sang Châu Âu và phần còn lại của thế giới sau khi có sự tiếp xúc của người Châu Âu với Châu Mỹ. Ở Việt Nam ngô được trồng vào thế kỷ thứ XVII.

Dựa vào hạt có mảy hay không có mảy, hình thái bên ngoài và cấu trúc nội nhũ của hạt, ngô được phân thành các loài phụ: ngô bọc, ngô đá, ngô răng ngựa, ngô đường, ngô nõ, ngô bột, ngô nếp, ngô đường bột, ngô bán răng ngựa. Từ các loài phụ căn cứ vào màu sắc hạt và màu sắc lõi ngô để phân thành các thứ. Đây là cách phân loại theo đặc điểm thực vật học, ngoài ra ngô còn được phân loại theo sinh thái học, nông học, thời gian sinh trưởng và thương phẩm [8].

1.1.2. Đặc điểm sinh học

Ngô là cây lương thực chỉ thấy ở dạng cây trồng bao gồm các bộ phận: rễ, thân, lá, hoa (bông cò, bắp ngô) và hạt.

Ngô có hệ rễ tiêu biểu cho bộ rễ cây hòa thảo. Tuy nhiên ngô có bộ rễ phát triển rất mạnh, nên có khả năng hút nước rất khỏe, hơn nhiều loài cây trồng khác. Hệ rễ của cây ngô hoàn chỉnh chia thành 3 nhóm: rễ mầm, rễ đốt, rễ chân kiềng. Rễ mầm mọc từ trụ lá mầm, chức năng chính của rễ này là hút nước, thức ăn khi cây còn non. Rễ đốt mọc vòng quanh các đốt thấp của thân. Đây là loại rễ quyết định quá trình sinh trưởng phát triển của cây ngô, nó giúp cây hút nước và các chất dinh dưỡng suốt đời sống của cây. Rễ chân kiềng

mọc quanh các đốt thấp sát mặt đất. Rễ này giúp cây chống đỡ và bám chặt vào đất, chúng cũng tham gia hút nước và thức ăn. Số lượng rễ, số lông rễ và độ dài rễ khác nhau ở mỗi giống. Đây là một chỉ tiêu quan trọng để đánh giá khả năng chịu hạn của cây.

Thân ngô đặc, đường kính từ 2 - 4 cm, cao từ 1,8 - 2 m. Thân ngô trưởng thành bao gồm nhiều lóng nằm giữa các đốt và kết thúc bằng bông cờ. Thân ngô ngoài nhiệm vụ giúp cây đứng vững, là bộ phận dự trữ và vận chuyển chất hữu cơ, ngoài ra còn có khả năng quang hợp để tổng hợp chất hữu cơ.

Lá ngô mọc từ mắt trên đốt và mọc đối xứng xen kẽ nhau. Các bộ phận của lá bao gồm: bẹ lá, phiến lá, thìa lá. Theo hình thái và vị trí trên thân, lá ngô được chia thành các nhóm: lá mầm, lá thân, lá bẹ, lá bi. Số lá, độ lớn của lá phụ thuộc vào giống, điều kiện thời tiết, kỹ thuật canh tác, mùa vụ, số lá ngô thường biến động từ 15 - 20 lá. Đặc điểm nổi bật là lá ngô có rất nhiều khí khổng. Trung bình một lá ngô có từ 2 - 6 triệu khí khổng, trên 1mm² lá có từ 500 - 900 khí khổng. Cơ chế đóng mở của lỗ khí khổng liên quan chặt chẽ tới điều kiện hạn hán. Lá ngô là cơ quan làm nhiệm vụ quang hợp, đồng thời làm nhiệm vụ trao đổi khí, hô hấp, dự trữ dinh dưỡng...

Ngô là loại cây có hoa khác tính cùng gốc. Cơ quan sinh sản đực (bông cờ) và cái (bắp) tuy cùng nằm trên một cây song ở những vị trí khác nhau. Hoa đực nằm ở đỉnh cây. Hoa cái phát sinh từ mầm nách lá trên thân, số mầm nách nhiều nhưng chỉ có từ 1 - 3 mầm nách trên cùng phát triển thành bắp. Số bắp trên cây phụ thuộc vào giống, vùng sinh thái, mật độ và phân bón.

Hạt ngô thuộc loại quả dĩnh gồm 5 phần chính: vỏ hạt, lớp alorôn, phôi, nội nhũ và chân hạt. Vỏ hạt bao xung quanh hạt là một màng nhẵn. Lớp alorôn nằm dưới vỏ hạt. Nội nhũ là phần chính của hạt chứa 70 - 78% khối lượng hạt với giá trị dinh dưỡng khá cao so với các loại hạt ngũ cốc khác.

Phôi ngô có: ngù (phần ngăn cách giữa nội nhũ và phôi), lá mầm, trụ dưới lá mầm, rễ mầm và chồi mầm. Trong bốn phần này thì lá mầm thường phát triển rõ rệt nhất. Phôi ngô lớn chiếm 8 - 15% trọng lượng hạt. Màu sắc hạt phụ thuộc đặc tính di truyền của giống và chủng loại, vì vậy hạt ngô có nhiều màu sắc khác nhau như: trắng, vàng, tím, da cam, đỏ... Mỗi bắp ngô có từ 200 - 1000 hạt phụ thuộc vào giống, điều kiện ngoại cảnh, sinh thái, trung bình mỗi bắp có từ 500 - 600 hạt.

Quá trình sinh trưởng, phát triển của cây ngô được chia thành hai giai đoạn: giai đoạn sinh dưỡng và giai đoạn sinh thực. Giai đoạn sinh dưỡng được tính từ khi gieo đến trổ cờ. Giai đoạn sinh thực được tính từ trổ cờ đến chín hoàn toàn. Căn cứ vào đặc điểm quá trình sinh trưởng phát triển có thể chia ra các giai đoạn sinh trưởng phát triển quan trọng sau đây: giai đoạn hạt nảy mầm và mọc; giai đoạn từ mọc đến 3 lá; giai đoạn từ 3 lá đến 7 lá; giai đoạn từ 7 lá đến trổ cờ; giai đoạn từ trổ cờ đến tung phân, phun râu; giai đoạn từ thụ phấn đến chín [8].

Trong từng giai đoạn cây ngô yêu cầu các điều kiện khác nhau và mỗi giai đoạn đều có ảnh hưởng khác nhau đến các yếu tố tạo thành năng suất và chất lượng hạt ngô [8].

1.1.3. Giá trị kinh tế của cây ngô

Ngô là một trong những cây lương thực quan trọng trong nền kinh tế toàn cầu. Bên cạnh vai trò cung cấp lương thực cho con người, ngô còn là nguyên liệu quan trọng của công nghiệp chế biến thức ăn gia súc và công nghệ sinh học. Nhiều nước đang sử dụng ngô để chế biến ethanol - năng lượng sạch của tương lai.

Ngô là cây lương thực nuôi sống gần 1/3 dân số trên toàn thế giới, tất cả các nước trồng ngô nói chung đều ăn ngô ở mức độ khác nhau. Nếu như ở châu Âu khẩu phần ăn cơ bản là: bánh mì, khoai tây, sữa; châu Á là cơm

(gạo), cá, rau xanh (canh) thì châu Mỹ La Tinh là bánh ngô, đậu đỗ và ớt. Ngoài ra, bắp ngô bao tử còn được sử dụng làm rau cao cấp, lấy hạt làm nguyên liệu chế biến các mặt hàng có giá trị dinh dưỡng cao như sữa ngô, ngô ngọt đóng hộp, đóng lọ...

Ngô là thức ăn giàu năng lượng, là thành phần quan trọng trong thức ăn hỗn hợp cho gia súc và gia cầm. Hầu như 70% chất dinh dưỡng trong thức ăn tổng hợp là từ ngô. Cây ngô còn là thức ăn xanh và ủ chua lý tưởng cho đại gia súc, đặc biệt là bò sữa.

Ngô cung cấp nguyên liệu cho công nghiệp. Người ta đã sản xuất khoảng 670 mặt hàng khác nhau của các ngành công nghiệp lương thực - thực phẩm, công nghiệp dược và công nghiệp nhẹ.

Ngoài ra ngô còn là nguồn hàng hóa xuất khẩu có giá trị cao. Trên thế giới hàng năm lượng ngô xuất nhập khẩu khoảng 70 triệu tấn đem lại nguồn lợi nhuận kinh tế lớn [9].

Ở Việt Nam, ngô là cây lương thực quan trọng thứ hai sau cây lúa và là cây màu quan trọng nhất được trồng ở nhiều vùng sinh thái khác nhau. Cây ngô không chỉ cung cấp lương thực cho người, vật nuôi mà còn là cây trồng xóa đói giảm nghèo tại các tỉnh có điều kiện kinh tế khó khăn [4].

1.1.4. Đặc điểm hóa sinh hạt ngô

Thành phần hydratcacbon ở ngô chủ yếu là tinh bột (60 - 70%), lipid chủ yếu là acid béo, protein ở dạng zein chiếm đa số, hàm lượng đường khoảng 3,5%, lượng tro khoảng 1 - 2,4%, chất khoáng chiếm trên 60% khối lượng của phôi [8].

Tinh bột ngô hình tròn, hình đa diện, góc cạnh rõ rệt, kích thước khoảng 8 - 35 μm . Tinh bột tập trung chủ yếu ở nội nhũ và được chia thành hai dạng là tinh bột mềm (tinh bột bột) và tinh bột cứng (tinh bột sừng). Đặc

điểm tinh bột của nội nhũ hạt là một tiêu chuẩn để phân loại loài ngô phụ. Hàm lượng tinh bột ở ngô tẻ (68%) nhiều hơn ở ngô nếp (65%) [8].

Tỷ lệ chất béo trong hạt ngô tương đối cao (3 - 6%), chủ yếu tập trung trong mầm ngô. Trong chất béo của ngô có 50% là acid linoleic, 31% là acid oleic, 13% là acid panmitic và 3% là stearic. Hàm lượng lipid là một chỉ tiêu quan trọng để đánh giá chất lượng hạt [5].

Tỷ lệ protein trong hạt ngô 8 - 12%. Protein chính của ngô là zein, một loại prolamin gần như không có lysine và tryptophan. Protein của ngô được chia thành 3 loại chính: protein hoạt tính (enzyme), protein cấu tạo và protein dự trữ, trong đó protein dự trữ chiếm tỷ lệ cao nhất. Hàm lượng protein cũng như các thành phần amino acid bị thay đổi bởi những tác động của các yếu tố di truyền (giống) và môi trường, kỹ thuật canh tác.

Vitamin của ngô tập trung ở lớp ngoài hạt ngô và ở mầm. Ngô cũng có nhiều vitamin C, vitamin B (B1, B2, B6..). Vitamin PP hơi thấp cộng với thiếu tryptophan một amino acid có thể tạo vitamin PP. Riêng ngô vàng chứa nhiều carotene (tiền vitamin A) [9].

1.1.5. Tình hình sản xuất ngô trên thế giới và Việt Nam

1.1.5.1. Tình hình sản xuất ngô trên thế giới

Với những giá trị kinh tế và sử dụng của mình, cây ngô được xem là cây lương thực quan trọng trong nền kinh tế toàn cầu chỉ đứng thứ ba sau lúa gạo và lúa mì. Ngô là cây có địa bàn phân bố rộng nhất thế giới, trải rộng từ 40° N đến gần 55° B, từ độ cao 1 - 2 m đến 400 m so với mực nước biển [9]. Do đó ngô được trồng ở hầu hết các nơi trên thế giới như Châu Mỹ, Châu Âu, Châu Úc, Châu Phi và Châu Á. Diện tích, năng suất, sản lượng ngô giữa các châu lục có sự chênh lệch nhau tương đối lớn được thể hiện ở bảng 1.1 [58].

Diện tích trồng ngô giữa các châu lục có sự chênh lệch nhau, trong đó Châu Mỹ là khu vực có diện tích trồng ngô lớn nhất, năm 2008 là

60,4 triệu ha đến năm 2010 là 63,1 triệu ha, chiếm gần 40% diện tích ngô trên toàn thế giới. Đứng thứ hai là Châu Á chiếm 33,2%. Châu Âu có diện tích trồng ngô thấp, chiếm khoảng 8,7% diện tích trồng ngô thế giới. Châu Mỹ là khu vực có năng suất cao nhất đạt 71,0 tạ/ha, đứng thứ hai là khu vực Châu Âu: 60,6 tạ/ha, thấp nhất là Châu Á: 45,8 tạ/ha (năm 2010). Sở dĩ Châu Á có năng suất thấp như vậy là do khu vực này có điều kiện bất thuận như; hạn hán, lũ lụt, đất canh tác chưa thuận lợi.

Bảng 1.1. Tình hình sản xuất ngô ở một số khu vực trên thế giới giai đoạn 2008 - 2010

Khu vực	Diện tích (Triệu ha)			Năng suất (Tạ/ha)			Sản lượng (Triệu tấn)		
	2008	2009	2010	2008	2009	2010	2008	2009	2010
Châu Âu	15,4	13,8	14,1	60,5	60,7	60,6	93,2	84,0	85,6
Châu Á	52,4	53,5	53,7	45,5	43,8	45,8	238,4	234,5	246,1
Châu Mỹ	60,4	61,4	63,1	68,6	71,9	71,0	439,5	441,5	447,9
Thế giới	161,2	158,8	161,9	51,3	51,6	52,1	827,5	819,7	844,4

(Nguồn FAOSTAT, 2011)

Giai đoạn 2008 - 2009, Châu Mỹ có năng suất tăng mạnh, tăng 3,3 tạ/ha; Châu Âu tăng nhẹ: 0,2 tạ/ha; khu vực Châu Á có năng suất giảm (giảm 1,7 tạ/ha) do các điều kiện bất thuận. Về sản lượng, Châu Mỹ là khu vực dẫn đầu sản lượng ngô trên toàn thế giới, năm 2008 đạt 439,5 triệu tấn chiếm 53,1% tổng sản lượng ngô trên toàn thế giới. Đứng thứ hai là khu vực Châu Á đạt 238,4 triệu tấn, chiếm 28,8% tổng sản lượng ngô trên toàn thế giới. Năm 2010 Châu Mỹ đạt 447,9 triệu tấn, chiếm 53,0% tổng sản lượng ngô trên toàn thế giới, khu vực Châu Á đạt 246,1 triệu tấn, chiếm 29,1% tổng sản lượng ngô trên toàn thế giới.

Như vậy, trong giai đoạn từ năm 2008 đến năm 2010 diện tích trồng ngô trên toàn thế giới tăng không đáng kể, nhưng do áp dụng các thành tựu

khoa học kỹ thuật tiên tiến, đặc biệt là việc mở rộng diện tích trồng ngô lai nên năng suất và sản lượng ngô của thế giới có sự nhảy vọt, nhất là ở các nước có nền kinh tế phát triển có điều kiện thâm canh cao và sử dụng 100% giống ngô lai trong sản xuất. Bên cạnh đó, việc ứng dụng công nghệ sinh học tạo ra các giống ngô chuyển gen có năng suất cao, có khả năng chống chịu sâu bệnh cũng góp phần đưa sản lượng ngô thế giới tăng cao. Tình hình sản xuất ngô ở các nước trên thế giới cũng có sự khác nhau [58].

Bảng 1.2. Tình hình sản xuất ngô của một số quốc gia trên thế giới năm 2010

Tên nước	Diện tích (Triệu ha)	Năng suất (Tạ/ ha)	Sản lượng (Triệu tấn)
Argentina	2,90	78,12	22,68
Mỹ	32,96	95,92	316,17
Brazin	12,81	43,75	56,06
Trung Quốc	32,52	54,60	177,54
Ấn Độ	7,18	19,60	14,10

(Nguồn FAOSTAT, 2011)

Trên thế giới, Mỹ là nước có diện tích, năng suất, sản lượng ngô lớn nhất đạt 32,96 triệu ha, với tổng sản lượng đạt 316,17 triệu tấn, năng suất bình quân đạt 95,92 tạ/ha. Kết quả trên có được, trước hết là nhờ sự đầu tư cho ngành nông nghiệp, không ngừng cải thiện các kỹ thuật canh tác, đồng thời ứng dụng công nghệ sinh học vào việc chọn tạo giống đã góp phần đưa năng suất và sản lượng ngô của nước này cao hơn các nước khác. Các giống cây trồng chuyển gen được tạo ra nhờ công nghệ sinh học đã được trồng phổ biến, đem lại lợi nhuận nông nghiệp cao, trong đó nước Mỹ tập trung vào các cây mũi nhọn là bông, đậu tương và ngô.

Có thể nói Mỹ và Trung Quốc là hai nước có diện tích trồng ngô lớn nhất và cao gấp nhiều lần so với các quốc gia khác. Mỹ và Trung Quốc, cùng với Ấn Độ là những nước xuất khẩu ngô lớn, các nước nhập khẩu ngô chính là Nhật Bản, Nam Triều Tiên, Malaysia, Mexico, châu Phi... [9].