

**ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN**  
**TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM**

***Nghiên cứu chuyển gen mã hóa protein  
expansin 1 liên quan đến sự kéo dài rễ vào  
giống đậu tương DT84***

**ĐẶNG VĂN HÀ**

***Người hướng dẫn: GS. TS Chu Hoàng Mậu***

**Thái Nguyên 2015**

# MỞ ĐẦU

## 1. Đặt vấn đề

Biến đổi khí hậu toàn cầu đang diễn biến hết sức phức tạp và ảnh hưởng nghiêm trọng đến các nước trên thế giới trong đó có Việt Nam. Tình trạng nóng lên của trái đất cũng được dự đoán sẽ gây tác động rất lớn đến các nước đang phát triển. Những nước có hệ thống nông nghiệp chịu chi phối lớn từ điều kiện thời tiết, nơi nhiệt độ chỉ tăng chút ít cũng làm giảm đáng kể sản lượng nông nghiệp. Tình trạng khan hiếm nước, có thể làm giảm khoảng 70% sản lượng cây nông nghiệp, trong đó có cây đậu tương. Cây đậu tương (*Glycine max* (L.) Merrill) là một loại cây trồng thuộc họ đậu, là cây trồng ngắn ngày có giá trị cao về mặt kinh tế, dinh dưỡng và là cây cải tạo đất. Tuy nhiên đậu tương là cây tương đối mẫn cảm với điều kiện ngoại cảnh và thuộc nhóm cây chịu hạn kém. Chính vì vậy tuyển chọn giống đậu tương có khả năng chịu hạn thích ứng với điều kiện hạn hán và thiếu nước là nhiệm vụ chiến lược của ngành chọn giống đậu tương.

Hai cơ chế chính liên quan đến khả năng chịu hạn của thực vật là sự điều chỉnh áp suất thẩm thấu và sự phát triển mạnh của bộ rễ. Bộ rễ là cơ quan trọng của cây thực hiện nhiệm vụ lấy nước cung cấp cho các hoạt động sống và phát triển của cơ thể thực vật. Cơ thể thực vật thích ứng với hạn bằng cách phát triển rễ cọc theo chiều dài vươn tới các lớp đất sâu hơn để hút nước dễ dàng hơn, đồng thời hệ thống rễ con phát triển mở rộng theo bề ngang có thể thích ứng tốt với việc tìm kiếm dinh dưỡng khoáng và nước trong lòng đất.

Expansin là một họ protein tác động trong việc kéo giãn của thành tế bào thực vật và được coi là một protein chủ yếu ảnh hưởng đến sự mở rộng

của tế bào thực vật. Các kết quả nghiên cứu cho thấy gen expansin ở cây đậu tương đóng một vai trò quan trọng trong việc kéo dài rễ của cây đậu tương, làm tăng sự phát triển cả rễ chính, cả rễ bên. Do vậy tiếp cận nghiên cứu theo hướng tăng cường mức độ biểu hiện của gen *GmEXPI* ở cây đậu tương bằng kỹ thuật chuyển gen sẽ là giải pháp công nghệ trong nghiên cứu tạo giống đậu tương chịu hạn. Xuất phát từ lý do trên chúng tôi đã xây dựng và nghiên cứu đề tài: “**Nghiên cứu chuyển gen mã hóa protein expansin 1 liên quan đến sự kéo dài rễ vào giống đậu tương DT84**”.

## **2. Mục tiêu nghiên cứu**

Tạo được dòng cây chuyển gen chứa gen mã hóa protein expansin 1 từ giống đậu tương DT84.

## **3. Nội dung nghiên cứu**

3.1. Nghiên cứu chuyển cấu trúc mang gen *expansin 1* (*GmEXPI*) thông qua lây nhiễm *A. tumefaciens* vào mô nách lá mầm hạt chín giống đậu tương DT84;

3.2. Nghiên cứu tái sinh *in vitro*, chọn lọc các dòng cây đậu tương chuyển gen;

3.3. Phân tích sự có mặt của gen chuyển *GmEXPI* trong các dòng cây chuyển gen ở thế hệ T<sub>0</sub> bằng kỹ thuật PCR.

## **Chương 1**

# TỔNG QUAN TÀI LIỆU

## 1.1. CÂY ĐẬU TƯƠNG

### 1.1.1. Đặc điểm sinh học của cây đậu tương

Đậu tương có bộ NST  $2n = 40$ , tên khoa học là *Glycine max* (L) Merrill, thuộc chi *Glycine*, họ đậu (*Fabaceae*), họ phụ cánh bướm (*papilionideae*) và bộ Phaseoleae. Đậu tương là một trong số những cây trồng có lịch sử lâu đời nhất của loài người.

Dựa vào sự đa dạng về hình thái của hạt, Fukuda (1933) và nhiều nhà khoa học đã thống nhất cây đậu tương có nguồn gốc từ vùng Mãn Châu (Trung Quốc) xuất phát từ một loại đậu tương dại, thân mảnh, dạng dây leo, có tên khoa học là *Glycine Soja Sieb và Zucc.* Từ Trung Quốc đậu tương được lan truyền sang các nước Đông Nam châu Á và dần lan rộng trên khắp thế giới, được nông dân các nước châu Á coi đây là một trong các cây trồng chính [12].

Cây đậu tương thuộc loại cây thân thảo, là loại cây trồng cạn thu hạt bao gồm các bộ phận rễ, thân, lá, hoa, quả và hạt.

Rễ đậu tương gồm rễ cái và nhiều rễ con, rễ cái ăn sâu 20-30 cm nhưng ở độ sâu 7-8cm rễ cái chỉ to bằng rễ con. Rễ con tập trung nhiều ở độ sâu 6-20cm và phát triển dồi dào. Rễ phát triển mạnh về cả chiều ngang và độ sâu, các rễ mọc sau phát triển về chiều ngang. Ở độ sâu 2-3cm khi gặp phải rễ cây bên cạnh thì chuyển hướng ăn sâu xuống đất. Rễ cây đậu tương khác với rễ cây hoà thảo là có rễ chính và rễ phụ, rễ chính có thể ăn sâu 30-50 cm và có thể trên 1m. Trên rễ chính mọc ra nhiều rễ phụ, rễ phụ cấp 2, cấp 3 tập trung nhiều ở tầng đất 7- 8cm, rộng 30- 40cm<sup>2</sup>. Trên rễ chính và rễ phụ có nhiều nốt

sần. Trên bộ rễ của cây đậu tương có rất nhiều nốt sần, đó là các u bướu nhỏ bám vào các rễ. Nốt sần là kết quả cộng sinh của một số loại vi sinh vật có tên khoa học là *Rhizobium Japonicum* với rễ cây đậu tương. Trong 1 nốt sần có khoảng 3- 4 tỉ vi sinh vật mà ta chỉ có thể nhìn thấy chúng qua kính hiển vi phóng đại từ 600- 100 lần nên đậu tương có vai trò cải tạo đất rất tốt, 1 ha trồng đậu tương nếu sinh trưởng phát triển tốt để lại trong đất từ 30-60 kg N.

Quá trình hình thành nốt sần: Trong đất luôn có nhiều loại vi sinh vật thường tập trung xung quanh bộ rễ, mặt khác xung quanh rễ do canh tác tạo điều kiện đất đai thuận lợi cho vi sinh vật phát triển. Cây họ đậu điều tiết ra các chất như glucit, đường galacto... đã hấp dẫn các loại vi sinh vật trong đó có vi sinh vật nốt sần vào rễ cây họ đậu. Nốt sần phát triển đến một giai đoạn nhất định thì cố định đạm. Bản thân nốt sần hút N còn vi sinh vật như chất xúc tác, khi già vi sinh vật đi ra ngoài. Nốt sần ở rễ đậu tương thường tập trung ở tầng đất từ 0-20cm, nốt sần ít dần và sâu hơn nữa thì có ít hoặc không có. Nốt sần đóng vai trò chính trong quá trình cố định đạm. Nốt sần có thể dài 1cm, đường kính 5-6mm, mới hình thành có màu trắng sữa, khi tốt nhất có màu hồng (màu globulin có cấu tạo gần giống hemoglobin trong máu có Fe).

Bộ rễ phân bố sâu, rộng hay hẹp, số lượng nốt sần ít hay nhiều phụ thuộc vào giống, đất đai, khí hậu và kỹ thuật trồng. Quá trình phát triển của bộ rễ có thể phân ra làm 2 thời kỳ.

*Thời kỳ thứ nhất:* Phát triển rễ đầu tiên, thời kỳ này rễ cái và rễ phụ đầu tiên phát triển mạnh, kéo dài ra và sinh ra nhiều rễ con, thời kỳ này thường kéo dài từ 30-40 ngày sau mọc.

*Thời kỳ thứ hai:* Lớp rễ đầu tiên phát triển chậm dần, rễ con không nhú ra nữa, thậm chí có một số rễ còn bị khô đi. Lúc này gốc thân gần cổ rễ có các rễ phụ nhỏ kéo dài ra và phát triển cho tới gần thu hoạch. Số lượng có thể 30-

40 rễ phụ ăn ở gần mặt đất. Lớp rễ này có nhiệm vụ cung cấp đầy đủ chất dinh dưỡng cho sự phát triển của thân, lá và làm quả.

Thân cây đậu tương thuộc thân thảo có hình tròn, trên thân có nhiều lông nhỏ. Thân khi còn non 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 trung bình có 14-15 lông, các lông ở phía dưới thường ngắn, các lông ở phía trên thường dài (vì những lông phía trên phát triển từ ngày 35- 40 trở đi vào lúc cây đang sinh trưởng nhanh nên lông thường dài). Tùy theo giống và thời vụ gieo mà chiều dài lông có sự khác nhau thường biến động từ 3-10cm. 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 dại 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. Căn cứ vào sự sinh trưởng và đặc điểm của thân người ta chia ra làm 4 loại: (1) Loại mọc thẳng: thân cứng, đường kính thân lớn, thân không cao lắm, đốt ngắn, quả nhiều tập trung thường là những giống ra hoa hữu hạn. (2) Loại bò: thân chính phân cành rất nhỏ, mềm, phủ trên bề mặt đất thành đám dây, thân rất dài, đốt dài, quả nhỏ phân tán. (3) Loại nửa bò: là loại trung gian giữa hai loại mọc thẳng và mọc bò. (4) Loại mọc leo: thân nhỏ rất dài, mọc bò dưới đất hay leo lên giá thể khác.

Cây đậu tương có 3 loại lá: 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), 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, có khi 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 mầm ở chùm hoa nào giữ vai trò chủ yếu cung cấp dinh dưỡng cho chùm hoa ấy.

Hoa đậu tương nhỏ, không hương vị, thuộc loại hoa đồng chu lưỡng tính trong hoa có nhị và nhụy, mỗi hoa gồm 5 lá đài, 5 cánh hoa có 10 nhị và 1 nhụy. Màu sắc của hoa thay đổi tùy theo giống và thường có màu tím, tím nhạt hoặc trắng. Đa phần các giống có hoa màu tím và tím nhạt. Hoa phát sinh ở nách lá, đầu cành và đầu thân. Hoa ra nhiều nhưng tỷ lệ rụng rất cao khoảng 30% có khi lên tới 80% [1].

Số quả biến động từ 2 đến 20 quả ở mỗi chùm hoa và có thể đạt tới 400 quả trên một cây. Một quả chứa từ 1 tới 5 hạt, nhưng hầu hết các giống quả thường từ 2 đến 3 hạt. Hạt đậu tương có nhiều hình dạng khác nhau: Hình tròn, hình bầu dục, tròn dẹt,... Giống có màu vàng giá trị thương phẩm cao. Trong hạt, phôi thường chiếm 2%, 2 lá tử điệp chiếm 90% và vỏ hạt 8% tổng khối lượng hạt. Hạt to nhỏ khác nhau tùy theo giống, khối lượng một nghìn

hạt thay đổi từ 20-400g trung bình từ 100-200g. Chu kỳ sống của cây đậu tương được chia ra 5 giai đoạn phát triển là giai đoạn nảy mầm – cây con; giai đoạn sinh trưởng thân, lá; giai đoạn ra hoa; giai đoạn hình thành quả, hạt và giai đoạn chín [1].

Giai đoạn nảy mầm: Cây con được tính từ khi gieo hạt giống xuống đất, hạt hút ẩm trương lên, rễ mọc ra, thân vươn lên đội hai lá mầm lên khỏi mặt đất, lá mầm xòe ra, thân mầm tiếp tục phát triển thành thân chính. Trong giai đoạn này cây con chủ yếu sống dựa vào nguồn chất dinh dưỡng dự trữ ở hai lá mầm, đến khi hết chất dinh dưỡng các lá mầm này chuyển dần sang màu vàng rồi rụng và đồng thời cùng lúc đó mà bộ rễ phát triển đủ khả năng hút nước và chất dinh dưỡng để nuôi cây. Giai đoạn này dài hay ngắn tùy thuộc ở điều kiện ngoại cảnh. Nếu gieo vào vụ hè thì giai đoạn này ngắn hơn giai đoạn ở vụ đông. Thông thường thời gian này khoảng 15- 20 ngày sau khi gieo. Thời kỳ này chính là thời kỳ quyết định mật độ của cây con cũng như sức sinh trưởng của cây đậu tương sau này.

Kể từ khi cây con ra được 1- 2 lá kép thì bắt đầu giai đoạn sinh trưởng của thân và lá kéo dài tới khi cây bắt đầu ra hoa. Thời kỳ đầu của giai đoạn này cây con sinh trưởng rất chậm, trong khi đó rễ của nó lại phát triển nhanh cả về chiều sâu lẫn chiều ngang, các nốt sần được hình thành và phát triển, mở đầu cho hoạt động cố định đạm khí trời để cung cấp cho cây. Đến thời kỳ cây chuẩn bị ra nụ, ra hoa thì tốc độ sinh trưởng của cây tăng lên nhanh. Chính lúc này là mấu chốt để tạo ra thân cây to, mập, các đốt ngắn. Giai đoạn này dài hay ngắn cũng tùy thuộc vào giống, thời vụ, điều kiện ngoại cảnh, nhưng nói chung vào khoảng 20- 40 ngày.

Khác với một số cây khác là cây đậu tương khi đã ra hoa thì các bộ phận khác như rễ, thân, lá vẫn tiếp tục sinh trưởng và phát triển. Giai đoạn



này sinh trưởng dài hay ngắn tùy thuộc vào đặc tính của giống là chín sớm hay muộn. Thời kì này cây đậu tương rất mẫn cảm với điều kiện khí hậu thời tiết bất thuận như mưa to, gió lớn, khô, nóng,... lúc đó mặc dù số hoa của mỗi cây có rất nhiều nhưng kết quả cuối cùng là số hoa được thụ phấn và kết quả sẽ rất ít, vì thông thường 75% số hoa thường bị thui và rụng

Quả đậu tương đầu tiên được hình thành trong vòng 7–8 ngày kể từ lúc hoa nở. Trong điều kiện bình thường sau khoảng 3 tuần lễ là quả phát triển đầy đủ. Lúc các chùm quả non đã xuất hiện thì các chất dinh dưỡng trong lá được vận chuyển về nuôi hạt làm cho hạt nảy mầm. Vào thời kì này sự sinh trưởng của cây chậm lại dần. Các yếu tố nhiệt độ, độ ẩm... trong giai đoạn này sẽ có tác động rất lớn đến tốc độ phát triển của quả và hạt.

Khi hạt đã phát triển đạt đến kích thước tối đa, các khoang hạt đã kín, quả đã đủ mẩy thì cây ngừng sinh trưởng. Khi các hạt đã rắn dần và đạt đến độ chín sinh lý vỏ hạt có màu sắc đặc trưng của giống, còn vỏ quả thì chuyển dần sang màu vàng, vàng tro, xám, lá của cây cũng chuyển dần sang úa vàng và rụng dần. Hàm lượng dầu trong hạt được ổn định sớm vào thời kì hạt đang phát triển nhưng hàm lượng protein thì vẫn còn chịu ảnh hưởng của điều kiện dinh dưỡng của cây cho đến cuối thời kì của quá trình chín.

### **1.1.2. Giá trị kinh tế của cây đậu tương**

Đậu tương là thực phẩm giàu giá trị dinh dưỡng. Hạt đậu tương chứa: 8% nước, 5% chất vô cơ, 15-25% glucose, 15-20% chất béo, 35-45% chất đạm với đủ các loại amino acid cần thiết (isoleucin, lysin, metionin, phenylalanin, tryptophan, valin) và nhiều nguyên tố, khoáng chất, Ca, Fe, Mg, P, K, Na, S, các vitamin A, B1, B2, D, E, F, các enzyme, sáp, nhựa, cellulose.

Giá trị kinh tế đậu tương trong nông nghiệp: Đậu tương là nguồn thức ăn tốt cho gia súc 1kg hạt đậu tương tương đương với 1,38 đơn vị thức ăn

chăn nuôi. Toàn cây đậu tương (thân, lá, quả hạt) có hàm lượng đạm khá cao cho nên các sản phẩm phụ như thân, lá tươi có thể làm thức ăn gia súc tốt vì nó có thành phần dinh dưỡng khá cao như N: 6,2%, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>: 0,7%, K<sub>2</sub>O: 2,4%.

Giá trị kinh tế đậu tương trong công nghiệp: Đậu tương là nguyên liệu của ngành công nghiệp khác nhau như chế biến cao su nhân tạo, sơn, mực in, xà phòng, chất dẻo, tơ nhân tạo, chất đốt nóng, dầu bôi trơn trong ngành hàng không nhưng chủ yếu dùng để ép dầu. Hiện nay trên thế giới đậu tương là cây đứng đầu về cung cấp nguyên liệu cho ép dầu, dầu đậu tương chiếm 50% tổng lượng dầu thực vật. Đặc điểm của dầu đậu tương là khô chậm, chỉ số iod cao, ngưng tụ từ -15<sup>0</sup>C đến 18<sup>0</sup>C. Từ dầu người ta chế ra hàng trăm sản phẩm công nghiệp khác như làm nến, xà phòng....

Ngoài ra cây đậu tương còn có giá trị cải tạo đất. Đậu tương là cây luân canh cải tạo đất tốt, 1ha trồng đậu tương nếu sinh trưởng tốt để lại trong đất từ 30-60kg N. Nếu bố trí cây đậu tương vào cơ cấu cây trồng hợp lý sẽ có tác dụng tốt đối với cây trồng sau, góp phần tăng năng suất cả hệ thống cây trồng và giảm chi phí cho việc bón N. Thân lá đậu tương dùng bón ruộng hay phân hữu cơ rất tốt bởi hàm lượng N trong thân chiếm 0,05 %, trong lá chiếm 0,19% [1], [12].

### **1.1.3. Tình hình sản xuất đậu tương trên thế giới và trong nước**

Đậu tương là cây trồng lấy hạt, cây có dầu quan trọng bậc nhất trên thế giới, đứng hàng thứ tư sau cây lúa mì, lúa nước và ngô. Do khả năng thích ứng rộng nên nó đã được trồng ở khắp năm châu lục, nhưng tập trung nhiều nhất ở châu Mỹ trên 70%, tiếp đến là châu Á.

Theo số liệu thống kê chính thức, Argentina niên vụ 2013- 2014 diện tích gieo trồng đạt 20,3 triệu ha, cao nhất từ trước tới nay, nhưng giảm so với mức 20,8 triệu ha mà chính phủ dự báo trước đó, do hạn hán ảnh hưởng tới