

MỞ ĐẦU

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây đậu xanh (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) là một loại cây công nghiệp quan trọng của nền nông nghiệp châu Á. Cây đậu xanh được trồng chủ yếu lấy hạt để chế biến thức ăn. Đậu xanh còn được xem như là một thứ dược liệu quý có tác dụng giải độc, thanh nhiệt, bớt sưng phù, điều hoà ngũ tạng, chữa bệnh cho con người. Hạt đậu xanh còn là một mặt hàng nông sản xuất khẩu có giá trị. Ngoài ra, sản phẩm phụ của cây đậu xanh được dùng làm thức ăn cho gia súc. Trồng đậu xanh còn có tác dụng chống xói mòn, cải tạo đất. Hệ rễ của cây đậu xanh có nốt sần chứa vi khuẩn cố định đạm. Trồng đậu xanh không những mang hiệu quả về mặt kinh tế và dinh dưỡng mà còn có tác dụng cải tạo đất [6], [8].

Hạt đậu xanh có chứa protein, lipid, glucid và nhiều loại chất khoáng cùng các loại vitamin. Chất lượng protein của đậu xanh được đánh giá dựa trên chỉ tiêu quan trọng là thành phần amino acid. Protein đậu xanh chứa đầy đủ các loại amino acid không thay thế. Nghiên cứu hàm lượng các loại amino acid không thay thế và các loại amino acid giới hạn trong protein đạt dinh dưỡng của FAO/WHO là một trong các hướng chiến lược trong chọn tạo giống đậu xanh chất lượng cao hiện nay.

Ở Việt Nam, cây đậu xanh được phân bố ở nhiều vùng địa lí khác nhau trong cả nước. Các giống đậu xanh hiện nay đang trồng ở nước ta có 2 nguồn gốc chính: một là các giống nhập từ AVRDC, qua chọn lọc, lai tạo, tuyển chọn, hai là các giống được người nông dân chọn lọc theo phương pháp truyền thống qua nhiều năm tại các địa phương.

Trong những năm gần đây, diễn biến khí hậu của nước ta ngày càng phức tạp, lượng mưa phân bố không đều giữa các vùng và các thời kì trong năm, hạn hán kéo dài cùng với sự biến đổi của các yếu tố môi trường khác đã tác động bất lợi đến sự sinh trưởng và phát triển, làm giảm năng suất và chất lượng hạt đậu xanh, gây suy giảm khả năng chống chịu của cây đậu xanh.

Đậu xanh là loại cây tương đối mẫn cảm với điều kiện ngoại cảnh và thuộc nhóm cây chịu hạn kém. Vì vậy, việc tuyển chọn giống đậu xanh có chất lượng cao, có khả năng chịu hạn là yêu cầu thực tiễn đặt ra cho ngành chọn giống đậu xanh.

Ở Việt Nam, những nghiên cứu trên đối tượng đậu xanh cũng đã và đang được tiến hành. Các nội dung được đề cập đến là: chọn tạo giống thích nghi với thời vụ và điều kiện sinh thái, nghiên cứu quy trình trồng và chăm sóc đậu xanh thích hợp, đánh giá chất lượng hạt và một số đặc điểm hóa sinh, phân lập gen liên quan đến khả năng chịu hạn,... Mục tiêu chung trong công tác chọn giống đậu xanh là: giống năng suất, chất lượng cao, chín tập trung, chống chịu tốt với điều kiện bất lợi của môi trường [7], [10], [13].

Những công trình nghiên cứu về cây đậu xanh trên thế giới và ở Việt Nam và ngày càng nhiều. Mặc dù vậy, sự hiểu biết về gen liên quan đến khả năng chịu hạn của đậu xanh vẫn còn là giới hạn. Vấn đề cần đặt ra là cần tìm hiểu mối quan hệ giữa đặc điểm sinh lý, hóa sinh và sinh học phân tử liên quan đến tính trạng chịu hạn của cây đậu xanh. Trên cơ sở đó có định hướng cho công tác chọn giống và cải tạo giống phù hợp nhằm tạo được các giống đậu xanh có khả năng chịu hạn tốt.

Tính chịu hạn ở thực vật thường là kết quả của nhiều cơ chế đáp ứng stress cùng hoạt động đồng thời. Gần đây, có một số nghiên cứu đã phân lập gen liên quan đến tính chịu hạn ở thực vật, trong số đó có đề cập đến gen cystatin.

Cystatin là chất ức chế có bản chất protein. Sự biểu hiện của các gen cystatin thường trong điều kiện hạn, lạnh, mặn và ở các pha riêng rẽ của quá trình sinh trưởng, phát triển của thực vật [17], [20], [21]. Pernas M. và cs (2000) cho rằng khi rễ cây dẻ (*Castanea sativa*) gặp lạnh, sốc muối, stress nóng thì mức độ phiên mã tăng mạnh ở cả tế bào rễ và tế bào lá, cystatin ở cây dẻ không chỉ liên quan đến phản ứng tự vệ với các mầm bệnh và sâu hại mà còn liên quan đến khả năng chống lại tác động bất lợi của môi trường [34].

Xất phát từ những lí do trên chúng tôi đã tiến hành đề tài: “**Đánh giá chất lượng hạt, khả năng chịu hạn và phân lập gen cystatin của một số giống đậu xanh (*Vigna radiata* (L.) Wilczek)**”.

2. MỤC TIÊU NGHIÊN CỨU

- Đánh giá chất lượng hạt của một số giống đậu xanh trên phương diện hoá sinh.
- So sánh khả năng chịu hạn của một số giống đậu xanh ở giai đoạn cây non và phân lập, xác định trình tự gen cystatin ở một số giống đậu xanh có mức độ chịu hạn khác nhau.

3. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

- Phân tích một số đặc điểm hình thái hạt như: màu sắc vỏ hạt, màu gốc thân và khối lượng 1000 hạt của 7 giống đậu xanh.
- Xác định hàm lượng protein, lipid và thành phần amino acid trong hạt ở 7 giống đậu xanh.
- Nghiên cứu tác động của hạn đến cây đậu xanh non ở giai đoạn 3, 5, 7, 9, 11 ngày tuổi.
- Tách chiết DNA tổng số.
- Sử dụng kỹ thuật PCR để nhân gen cystatin từ các giống đậu xanh.
- Chọn dòng gen và tách plasmid mang gen cystatin.
- Đọc trình tự gen cystatin của 2 giống đậu xanh: một giống chịu hạn tốt và một giống chịu hạn kém.

Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. CÂY ĐẬU XANH

1.1.1. Nguồn gốc, phân loại, đặc điểm sinh học và giá trị kinh tế của cây đậu xanh

Đậu xanh có tên khoa học là *Vigna radiata* (L.) Wilczek ($2n=22$). Trong lịch sử phân loại, đậu xanh còn có tên là *Phaseolus radiatus* hay *Phaseolus aureus* Roxb. Đậu xanh có nguồn gốc từ Ấn Độ, phân bố rộng ở các nước thuộc châu Á, Đông Nam Á hoặc khu vực Đông Dương và Myama sau đó nó được mang tới hầu hết các châu lục khác.

Cây đậu xanh thuộc họ *Fabaceae* chi *Vigna*, chi phụ *Ceratotropis*. Hiện nay, chi *Vigna* được biết tới có 7 chi phụ: *Vigna*, *Plectotropis*, *Ceratotropis*, *Lasionspron*, *Sigmoidotropis*, *Haydonia*, *Macrohynchus*. Trong đó, đậu xanh là một trong số 16 loài của phân chi *Ceratotropis* [6], [14].

Bên cạnh những cây lương thực như lúa, ngô, lạc... thì đậu xanh cũng là loại cây trồng có giá trị kinh tế cao, vì nhiều thành phần quan trọng chứa trong hạt đậu xanh như protein, glucid, các loại vitamin, các loại khoáng chất. Vì thế, đậu xanh được con người sử dụng với nhiều mục đích khác nhau. Mỗi vùng miền ở Việt Nam có những cách chế biến riêng để từ đậu xanh tạo ra các món ăn đặc sản. Ngoài ra, đậu xanh còn có thể được sử dụng làm thuốc chữa bệnh... Hệ thống rễ của đậu xanh có những nốt sần, trên nốt sần có chứa các vi khuẩn cố định đạm giúp tăng giá trị dinh dưỡng cho đất [3], [8].

Đậu xanh là cây trồng cạn thu quả và hạt, bao gồm các bộ phận rễ, thân, lá, hoa, quả. Cây đậu xanh là cây thân thảo, mọc thẳng đứng hoặc hơi nghiêng, thân yếu có lớp lông mịn màu nâu sáng, chiều cao trung bình từ 40-70 cm, đường kính trung bình từ 8-12 mm. Thân cây gồm 7- 8 đốt. Thân phân cành

muộn và trung bình có từ 2-5 cành, một số giống có 9, 10 cành phụ thuộc vào giống và điều kiện chăm sóc.

Lá đậu xanh là lá kép mọc cách, lá chét có 3 thùy với nhiều hình dạng như ôvan, thuôn dài, lưỡi mác. Trên thân chính của cây có 7-8 lá. Khi cây có lá thứ 5 nụ hoa được hình thành. Hoa đậu xanh là hoa lưỡng tính, mọc thành chùm trên trục hoa. Hoa đậu xanh thường nở rải rác nên người ta chia hoa đậu xanh thành 3 nhóm chính:

- Nhóm ra hoa không tập trung: Hoa nở liên tiếp trong 30 ngày.
- Nhóm ra hoa tập trung: Hoa nở kéo dài trong 16 ngày trở lại.
- Nhóm ra hoa trung gian: Hoa nở trong vòng 16-30 ngày.

Dện tích của các lá tăng từ lá d ưới lên các lá giữa thân rồi giảm dần lên các lá phía ngọn. Số lá và hình dạng lá thay đổi tùy giống, đất trồng và thời vụ [6]. Chỉ số diện tích lá (m^2 lá/ m^2 đất) có ảnh hưởng lớn đến hiệu suất quang hợp và năng suất thu hoạch.

Rễ đậu xanh bao gồm rễ chính và rễ con, rễ chính sâu khoảng 20-30 cm, có khi sâu đến 70-100 cm. Rễ cây đậu xanh có nhiều nốt sần chứa vi khuẩn cố định đạm. Từ các kẽ nhánh rễ, đặc biệt gần sát rễ chính có chứa nhiều nốt sần (30-40 nốt sần/cây).

Quả đậu xanh thuộc loại quả giáp, hình trụ, dạng tròn hơi dẹt, dài từ 8-10 cm, đường kính từ 4-6 mm, có 2 gân nổi dọc theo 2 bên cạnh quả. Quả chín có màu vàng, nâu hoặc đen nhưng chủ yếu vẫn là màu đen. Mỗi cây có từ 8-35 quả, mỗi quả có từ 8-15 hạt [6], [14]. Vỏ quả nếu chín gặp nhiệt độ cao có thể tách cho hạt rơi ra. Vỏ quả đậu xanh thường mỏng hơn so với vỏ quả của một số cây đậu đỗ khác.

Hạt đậu xanh có hình trụ, thuôn, tròn đều, có màu xanh xám, xanh bóng, vàng mốc, đen xám... nằm ngấn cách nhau bằng những vách xóp của quả. Số

hạt trên quả và khối lượng hạt có tương quan tỷ lệ thuận với năng suất. Đậu xanh là cây trồng ngắn ngày, trồng vào mùa ẩm áp, nhiệt độ tối ưu cho cây sinh trưởng và phát triển từ 20-30⁰C. Thời gian sinh trưởng của cây đậu xanh phụ thuộc vào từng giống, dao động khoảng 60-100 ngày.

Quá trình sinh trưởng và phát triển của cây đậu xanh được chia thành 2 giai đoạn: sinh trưởng sinh dưỡng (V) và sinh trưởng sinh thực (R) [18].

- Giai đoạn sinh trưởng sinh dưỡng được chia làm nhiều giai đoạn. Rễ đầu tiên phát sinh từ phần nhô ra của hạt kéo dài và đâm xuyên vào đất phát triển thành rễ chính của cây. Song song với sự phát triển của rễ là sự phát triển của thân mầm, sau khi nảy mầm lá mầm tự teo đi. Khi cây cao 15-18 cm trên thân có một đốt lá đơn và 2 đốt lá kép, thì rễ bắt đầu hình thành các nốt sần. Khi cây cao 23-27 cm, cây có 3 đốt mang lá kép mở rộng. Khi cây cao 37-41 cm, cây có 6 đốt mang lá kép mở rộng. Cứ sau khoảng 5 ngày, cây lại chuyển sang một giai đoạn sinh trưởng sinh dưỡng mới.

- Giai đoạn sinh trưởng sinh thực: Được chia làm 8 giai đoạn cơ bản

- + Giai đoạn cây bắt đầu ra hoa.
- + Giai đoạn hoa phát triển đầy đủ.
- + Giai đoạn hình thành quả.
- + Giai đoạn quả phát triển.
- + Giai đoạn hình thành hạt.
- + Giai đoạn quả chắc.
- + Giai đoạn quả chín sinh lý.
- + Giai đoạn quả chín hoàn toàn.

Đậu xanh sinh trưởng và phát triển trong phạm vi nhiệt độ khá rộng 16-36⁰C, năng suất đạt cao nhất trong khoảng nhiệt độ 22-27⁰C. Sự ra hoa của đậu xanh có mối quan hệ chặt chẽ với nhiệt độ môi trường và thời gian chiếu sáng.

1.1.2. Đặc điểm hoá sinh của hạt đậu xanh

Cây đậu xanh (*Vigna radiata* (L.) Wilczek) là loại cây trồng có giá trị kinh tế cao. Về dinh dưỡng, hạt đậu xanh là nguồn thực phẩm giàu đạm (khoảng 24-28%), ngoài ra còn lipid 1,3%, glucid 60% và các chất khoáng như Ca, Fe, Na, K... cùng nhiều vitamin tan trong H₂O như A, B₁, B₂, C... Giá trị sinh học của đậu xanh (phần đạm mà cơ thể hấp thụ và giữ lại được) khoảng 40,66%.

Hàm lượng protein dự trữ trong hạt đậu xanh trung bình khoảng 24%. Chức năng của protein dự trữ là cung cấp nguồn amino acid và nitơ cho quá trình nảy mầm của hạt. Protein dự trữ trong hạt của cây họ đậu chủ yếu là globulin (60%), albumin (12%), glutein (21%), prolamin (1%). Protein của hạt đậu xanh chứa đầy đủ các loại amino acid và amino acid không thay thế như lysine, methionine, phenylalanine, threonine, valine, leucine, isoleucine, tryptophan. Hạt đậu xanh có hàm lượng lysine cao, nhưng hàm lượng methionine thấp [3], [6].

Đậu xanh có hàm lượng lipid thấp hơn so với các cây họ đậu khác. Hàm lượng lipid thay đổi tùy thuộc vào giống, hệ gen. Hàm lượng lipid của đậu xanh trung bình khoảng 1,3%. Lipid trung tính chiếm phần lớn. Ngoài ra, trong đậu xanh còn có glycolipid, phospholipid

α -amylase thuộc nhóm hydrolase có trong cơ thể động vật (nước bọt, tụy tạng), thực vật (hạt hoà thảo nảy mầm), nấm mốc, vi khuẩn. α -amylase phân giải các liên kết 1,4-glycoside ở giữa chuỗi mạch polysaccharide, tạo thành các dextrin phân tử thấp. Do đó, dưới tác dụng của enzyme này làm dung dịch tinh bột nhanh chóng bắt màu với dung dịch iot và bị giảm độ nhớt mạnh. Ion canxi có tác dụng làm bền cấu trúc không gian của phân tử enzyme. α -amylase tương đối bền với nhiệt hơn amylase khác nhưng lại kém bền với acid. Trình tự DNA của gen α -amylase ở đậu xanh đã được phân lập [27].

Protease đóng vai trò rất quan trọng trong cơ thể thực vật và trong quá trình nảy mầm của hạt. Sự có mặt của protease trong hạt đang nảy mầm là bằng chứng về sự tham gia của chúng trong quá trình phân giải protein. Protease cũng tham gia vào phân giải các protein lạ hoặc bị biến tính khi gặp điều kiện cực đoan (hạn, lạnh, mặn,...) .

1.2. GEN CYSTATIN VÀ KHẢ NĂNG CHỊU HẠN CỦA CÂY ĐẬU XANH

1.2.1. Hạn và ảnh hưởng của hạn tới cây đậu xanh

Hạn là khái niệm dùng để chỉ sự thiếu nước của thực vật do môi trường gây nên làm ảnh hưởng đến sinh trưởng của thực vật. Hạn cũng có thể được định nghĩa là sự thiếu nước do mưa hoặc tưới nước trong một thời gian dài tạo sự cạn kiệt độ ẩm trong đất và gây nên tổn thương cho thực vật.

Có hai loại hạn cơ bản là hạn thật (hạn đất và hạn không khí) và hạn sinh lí. Hạn đất là do lượng nước trong đất giảm làm hệ rễ của cây không thể lấy nước từ đất vào tế bào dẫn đến cây bị héo. Hạn không khí là do nhiệt độ cao và độ ẩm thấp gây nên héo tạm thời vì cây không hút đủ nước mà lại thoát hơi nước nhanh. Hạn sinh lí là do mất cân bằng áp suất thẩm thấu giữa môi trường bên ngoài và tế bào nên cây không hút được nước mặc dù nước vẫn được cung cấp đầy đủ.

Khả năng thực vật có thể giảm thiểu mức tổn thương do thiếu hụt nước gây ra gọi là tính chịu hạn. Những cây trồng có khả năng duy trì sự phát triển trong điều kiện khô hạn gọi là cây chịu hạn [39], [40].

Mỗi cây trồng có một giới hạn nhất định đối với các nhân tố sinh thái của môi trường như hạn, nóng, lạnh... Nếu ở ngoài giới hạn đó có thể gây hại cho sự sinh trưởng và phát triển của cây, giảm năng suất sinh học. Đã có nhiều công trình nghiên cứu về khả năng chịu hạn của cây đậu tương, ngô, lúa, đậu xanh [1], [5], [10], [12], [13].

Khi nhiệt độ tăng lên trên ngưỡng nhất định của từng loại cây trồng thì quá trình hô hấp diễn ra mạnh dẫn đến sự mất cân bằng trao đổi chất làm ảnh hưởng đến nguồn cacbonhydrat dự trữ trong cây. Phản ứng của cây đối với hạn là sự đóng của khí khổng, giảm tỷ lệ thoát hơi nước của mô, giảm quang hợp và tăng tích lũy abscisic acid (ABA), proline, manitol, sorbitol, sự cấu thành nhóm ascobat, glutathion, ... và sự tổng hợp protein mới [28], [29]. Hạn còn dẫn đến một số biến đổi trong mô và tế bào, phá huỷ hệ thống quang hoá II trên màng thylacoid.

Cơ chế chống chịu hạn ở thực vật rất phức tạp liên quan tới các đặc điểm sinh lý, hóa sinh và các gen trong cơ thể thực vật. Nghiên cứu tính chịu hạn ở thực vật người ta thấy có nhiều biến đổi ở các mức độ khác nhau trong các giai đoạn phát triển khác nhau. Tính chống chịu của đậu xanh do nhiều gen quyết định. Cho đến nay người ta vẫn chưa tìm thấy một gen nào quyết định tính chịu hạn của thực vật nói chung và của đậu xanh nói riêng.

Nghiên cứu khả năng chịu hạn của đậu xanh là rất cần thiết nhằm chọn tạo các giống đậu xanh có khả năng chịu hạn tốt. Tuy nhiên, số công trình nghiên cứu về khả năng chịu hạn và các gen liên quan đến tính chịu hạn của cây đậu xanh còn hạn chế. Với mục tiêu nghiên cứu cơ sở phân tử của tính chịu hạn, các gen liên quan đến khả năng chịu hạn như HSC70, Rubisco, LEA, PLC và cystatin ở đậu xanh cũng đã được thảo luận trên các tạp chí chuyên ngành [19], [30], [31], [32], [41].

1.2.2. Cơ sở hoá sinh và sinh học phân tử của tính chịu hạn

Chịu hạn ở thực vật thường là kết quả của nhiều cơ chế đáp ứng stress hoạt động cùng đồng thời. Các nghiên cứu gần đây đưa ra một số cơ sở hoá sinh và sinh học phân tử của tính chịu hạn gồm: các gen chức năng (LEA, HSP, LTP,...), các gen điều khiển phiên mã, vai trò của bộ rễ, khả năng điều chỉnh áp

suất thẩm thấu, abscisic acid (ABA), sự truyền tín hiệu và các nhân tố ức chế protease.

1.2.2.1. Các gen chức năng

Các gen chức năng có liên quan đến khả năng chịu hạn được biết đến là: LEA, chaperons, HSP, LTP....

* **HSP (Heat Shock Protein) và môi giới phân tử (Chaperons):** HSP chiếm khoảng 1% protein tổng số trong lá và có ở hầu hết các loài thực vật. Sự xuất hiện của HSP có chức năng ngăn cản hoặc sửa chữa sự phá huỷ của stress. HSP xuất hiện trong cả các quá trình sinh trưởng bình thường, các giai đoạn biệt hoá mô và trong thời kì sinh trưởng của thực vật. Chúng được tổng hợp thêm trong điều kiện cực đoan của môi trường. Dựa vào khối lượng phân tử người ta phân loại HSP ở thực vật ra làm 6 nhóm: HSP 110, HSP90, HSP 70, HSP 60, HSP 20, HSP 8.5. Trong nhóm HSP có rất nhiều đại diện của chất môi giới phân tử (MGPT) là HSP 70, HSP 60, nhưng cũng có những HSP không phải là môi giới phân tử (HSP8.5- Ubiquitin). Ubiquitin được mệnh danh là người bảo vệ tế bào, chúng có hoạt tính protease, thực hiện chức năng phân giải các protein bị biến tính không có cấu trúc đúng, ngăn chặn các protein này gây độc cho tế bào. MGPT là một nhóm gồm nhiều loại protein khác nhau. Phần lớn các MGPT có hoạt tính ATPase. Chức năng chính của MGPT là tham gia tạo cấu trúc không gian đúng cho protein mới được tổng hợp, chuyển protein qua màng, duy trì cấu trúc đặc hiệu của protein, ngăn chặn sự huỷ hoại protein chưa tạo cấu trúc không gian, khởi đầu cho sự phân huỷ protein biến tính [13], [41]. MGPT có 5 họ chính là: HSP 70 (Dnak), HSP 60 (Chaperonin), HSP 90, HSP 100 và sHSP (small HSP). Các phân tử HSP được định vị trong bào chất và nội bào quan như là nhân, ty thể, lục thể và lưới nội chất [38].