

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

**Ngô Thị Hiền**

**NGHIÊN CỨU CHUYÊN CẤU TRÚC RNAi VÀO GIỐNG  
ĐẬU TƯƠNG DT84 PHỤC VỤ TẠO DÒNG CÂY CHUYÊN  
GEN KHÁNG SOYBEAN MOSAIC VIRUS**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC**

**Thái Nguyên – 5 / 2015**

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

**NGÔ THỊ HIỀN**

**NGHIÊN CỨU CHUYỂN CẤU TRÚC RNAi VÀO  
GIỐNG ĐẬU TƯƠNG DT84 PHỤC VỤ TẠO DÒNG  
CÂY CHUYỂN GEN KHÁNG SOYBEAN MOSAIC VIRUS**

*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 – 5/2015**

## MỞ ĐẦU

### 1. Đặt vấn đề

Đậu tương (*Glycine max* (L.) Merrill) thuộc họ đậu (*Fabaceae*), là cây công nghiệp ngắn ngày, có giá trị kinh tế và hàm lượng dinh dưỡng cao, lại dễ trồng. Ngoài ra trồng cây đậu tương còn có tác dụng cải tạo đất nhằm tăng năng suất của các giống cây trồng khác. Ở Việt Nam, cây đậu tương được trồng cả 7 vùng nông nghiệp trên cả nước, trong đó 65% ở miền Bắc và 35% ở miền Nam. Hiện nay năng suất và sản lượng đậu tương vẫn còn thấp và còn phải nhập khẩu từ các nước khác để đáp ứng nhu cầu tiêu dùng và làm thức ăn cho gia súc [53]. Bên cạnh những yếu tố như hạn hán, kỹ thuật canh tác thì nguyên nhân bệnh do côn trùng, do vi khuẩn và virus gây ra cũng ảnh hưởng không nhỏ đến năng suất, chất lượng đậu tương. Hiện nay người ta đã xác định được khoảng 30 loại bệnh hại ở cây đậu tương, trong đó có các bệnh do nhiễm virus gây tổn thất lớn cho ngành sản xuất đậu tương [13]. Bệnh khảm lá đậu tương là bệnh hại xuất hiện phổ biến ở cây đậu tương do Soybean mosaic virus (SMV) thuộc nhóm *Potyvirus* gây ra. Đậu tương bị nhiễm SMV ở thời điểm trước khi ra hoa năng suất có thể giảm tới 40% và 91% hạt đậu thu được có vết lốm đốm, chất lượng kém [35].

SMV có thể lan truyền trong quần thể đậu tương do rệp, hoặc do cơ học. Hiện nay, những biện pháp thường sử dụng để ngăn chặn sự lan truyền của SMV chỉ có tính chất phòng bệnh mà không thể chống lại triệt để. Tuy nhiên, nhờ ứng dụng kỹ thuật RNA interference (RNAi) người ta đã tạo ra cây trồng có khả năng kháng lại bệnh do virus bằng cách đưa chính gen của virus gây bệnh vào hệ gen của cây chủ. Theo hướng nghiên cứu này, nhiều giống cây trồng chuyển gen kháng được các loại bệnh virus khác nhau đã được tạo ra, như cây đậu chuyển gen kháng virus BGMV (bean golden mosaic virus), cây thuốc lá chuyển gen kháng virus khảm dưa chuột (CMV), kháng virus khảm thuốc lá (TMV).

Xuất phát từ những lí do trên, chúng tôi đã lựa chọn đề tài “***Nghiên cứu chuyển cấu trúc RNAi vào giống đậu tương DT84 phục vụ tạo dòng cây chuyển gen kháng Soybean mosaic virus***”.

## **2. Mục tiêu nghiên cứu**

Tạo được dòng cây chuyển gen mang cấu trúc RNAi chứa đoạn gen CPI của SMV ở giống đậu tương DT84.

## **3. Nội dung nghiên cứu**

Nghiên cứu lây nhiễm *A. tumefaciens* mang cấu trúc RNAi vào mô nách lá mầm hạt chín của giống đậu tương DT84. Tái sinh *in vitro*, chọn lọc và tạo dòng cây đậu tương chuyển gen mang cấu trúc RNAi;

Phân tích sự có mặt của gen chuyển trong các dòng cây chuyển gen bằng kỹ thuật PCR. Xác định hiệu suất chuyển gen.

## Chương 1

### TỔNG QUAN TÀI LIỆU

#### 1.1. Cây đậu tương

##### 1.1.1. Giá trị dinh dưỡng của đậu tương

Hạt đậu tương có thành phần dinh dưỡng cao, hàm lượng protein trung bình khoảng 38-40%, lipid từ 18-20%, giàu vitamin và muối khoáng. Đậu tương là loại hạt duy nhất mà giá trị của nó được đánh giá đồng thời cả protein và lipid. Protein của đậu tương có phẩm chất tốt nhất trong các loại protein thực vật. Hàm lượng protein cao hơn cả ở cá, thịt và cao gấp hai lần hàm lượng protein có trong các loại đậu đỗ khác [14]. Hàm lượng các axit amin có chứa lưu huỳnh như methionin, sistein,... của đậu tương rất gần với hàm lượng của các chất này của trứng. Hàm lượng của casein, đặc biệt là của lizin rất cao, gần gấp rưỡi trứng. Vì thế mà khi nói giá trị của protein ở đậu tương cao là nói hàm lượng lớn của nó cả sự đầy đủ và cân đối của các loại axit amin cần thiết. Protein của đậu tương dễ tiêu hóa hơn thịt và không có các thành phần tạo nên cholesterol. Không có các dạng axit uric... Ngày nay, người ta mới biết thêm nó có chứa chất lexithin, có tác dụng làm cho cơ thể trẻ lâu, sung sức, làm tăng thêm trí nhớ và tái sinh các mô, làm cứng xương và tăng sức đề kháng của cơ thể.

Hạt đậu tương có chứa hàm lượng dầu béo cao hơn các loại đậu đỗ khác nên được coi đây là cây cung cấp dầu thực vật. Hiện nay các nước có mức sống cao người ta lại ưa chuộng dầu thực vật hơn mỡ động vật. Lipid của đậu tương chứa một tỷ lệ cao các axit béo chưa no có hệ số đồng hóa cao, mùi vị thơm ngon. Dùng dầu đậu tương thay mỡ động vật có thể tránh được xơ vữa động mạch [14]. Trong đậu tương còn có khá nhiều loại vitamin, đặc biệt là hàm lượng vitamin B1 và B2, ngoài ra còn có các loại vitamin PP, A, E, K, D, C... và

các loại muối khoáng khác [14]. Do đó mà từ hạt đậu tương người ta đã chế biến ra được trên 600 sản phẩm khác nhau, trong đó có hơn 300 loại thức ăn bằng các phương pháp cổ truyền, thủ công và hiện đại dưới các dạng tươi, khô, lên men... như làm giá, sữa đậu nành, xì dầu... cho đến các sản phẩm cao cấp như đậu tương, socola- đậu tương, bánh kẹo, pate, thịt nhân tạo... ngay như ở nước ta, từ hàng ngàn năm nay đậu tương đã được cung cấp như một phần nhu cầu chất đạm cho người và gia súc, thông qua các món ăn cổ truyền được chế biến từ đậu tương, phần nào tạo ra được sự cân bằng dinh dưỡng trong khẩu phần thức ăn cho người dân. Đậu tương có thể chế biến thành giò, chả cho người ăn chay.

Đậu tương còn là vị thuốc để chữa bệnh, đặc biệt là hạt đậu tương đen, có tác dụng tốt cho tim mạch, gan, thận, dạ dày và ruột, làm thức ăn tốt cho người bị bệnh đái tháo đường, thấp khớp, mới ốm dậy hoặc do lao động quá sức. Các chất lexitin và casein có trong đậu tương có thể dùng riêng hoặc phối hợp để làm thuốc bổ dưỡng.

Bột đậu tương sau khi đã ép lấy dầu, bã dùng làm nguyên liệu chế biến thức ăn tinh hỗn hợp giàu đạm để nuôi gia súc, gia cầm theo hướng công nghiệp. Thân lá cây đậu tương có thể dùng làm thức ăn gia súc gia cầm rất tốt. Ở nhiều nước phát triển người ta còn dùng đậu tương vào các ngành công nghiệp khác như chế biến cao su nhân tạo, sơn, mực in, xà phòng, chất dẻo, tơ nhân tạo, chất đốt lỏng, dầu bôi trơn trong ngành hàng không.

Đậu tương còn có khả năng tích lũy chất đạm của khí trời để tự túc và làm giàu đạm cho đất nhờ sự cộng sinh giữa vi khuẩn nốt sần ở bộ rễ. Trong điều kiện thuận lợi, các vi khuẩn nốt sần này có thể tích lũy được một lượng đạm tương đương từ 20- 25 kg ure/ha. Do vậy có thể nói mỗi nốt sần như một “nhà máy đạm tí hon”, bởi vậy nên trồng đậu tương không những tốn ít phân đạm mà còn làm cho đất tốt lên, có tác dụng tích cực trong việc cải tạo bồi dưỡng đất [14].

### 1.1.2. Đặc điểm sinh học

Cây đậu tương (*Glycine max* (L) Merrill) thuộc họ Đậu (*Fabaceae*), có nguồn gốc từ cây đậu tương hoang dại (*Glycine ussuriensis*) dạng thân leo, sống hàng năm được phát hiện ở Trung Quốc, Nhật Bản, và Triều Tiên. Chúng có rất nhiều chủng khác nhau, thích nghi với điều kiện khí hậu từ ôn đới đến nhiệt đới [14].

Rễ cây đậu tương khác với rễ cây hoà thảo là có rễ chính và rễ phụ. Rễ chính có thể ăn sâu 30-50cm 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 7-8 cm rộng 30-40 cm<sup>2</sup>. Trên rễ chính và rễ phụ có nhiều nốt sần. Bộ rễ phân bố nông sâu, rộng hẹp, số lượng nốt sần ít hay nhiều phụ thuộc vào giống, đất đai, khí hậu và kỹ thuật trồng [14]. Trong điều kiện đất chua quá hoặc kiềm quá nốt sần hình thành kém. pH thích hợp cho sự hình thành của nốt sần là 6-7, vì vậy việc lựa chọn đất trồng đậu tương thích hợp rất quan trọng. Điều kiện dinh dưỡng cũng ảnh hưởng rất lớn đến sự phát triển của nốt sần. Nhìn chung bón đầy đủ NPK thì nốt sần phát triển mạnh, bón P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> có tác dụng thúc đẩy sự phát triển của nốt sần, còn hiệu quả kali không rõ lắm. Bón đạm không thích hợp ức chế sự hình thành và phát triển của nốt sần. Nốt sần ở rễ đậu tương thường tập trung ở tầng đất 0-20cm, từ 20-30cm nốt sần ít dần và nếu sâu hơn nữa thì có ít hoặc không có. Nốt sần đóng vai trò chính trong quá trình cố định đạm khí trời cung cấp cho cây. Lượng đạm cung cấp cho cây khá lớn khoảng 30-60 kg/ha. Nốt sần có thể dài 1 cm, đường kính 5 - 6 mm, mới hình thành có màu trắng sữa, khi tốt nhất có màu hồng. Quan hệ giữa vi sinh vật nốt sần với cây đậu tương là mối quan hệ cộng sinh: cây cung cấp chất dinh dưỡng cho vi khuẩn hoạt động, ngược lại vi khuẩn lại tổng hợp nitơ tự do của không khí chuyển sang dạng đạm hữu cơ cây có thể sử dụng được [14].

Thân cây đậu tương thuộc thân thảo, có hình tròn, trên thân có nhiều lông nhỏ. Thân khi còn non có màu xanh hoặc màu 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 màu xanh thì hoa màu trắng và nếu khi còn non thân có màu tím thì hoa có màu tím đỏ. Thân có trung bình 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 - 10 cm. Cây đậu tương trong vụ hè thường 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 m - 1,0 m. Những giống thân nhỏ lông dài dễ bị đổ hay mọc bò thường làm thức ăn cho gia súc. Những giống thân to thường là thân đứng và có nhiều hạt và chống được gió bão. Toàn thân có một lớp lông tơ ngắn, mọc dày bao phủ từ gốc lên đến ngọn, đến cả cuống lá. Thực tế cũng có giống không có lông tơ. Những giống có mật độ lông tơ dày, màu sẫm có sức kháng bệnh, chịu hạn và chịu rét khoẻ. Ngược lại những giống không có lông tơ thường sinh trưởng không bình thường, sức chống chịu kém. Thân có lông tơ nhiều ít dài ngắn, dày thưa là một đặc điểm phân biệt giữa các giống với nhau. 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 [14].

Về quá trình phát triển của cây đậu tương, khi cây đã có 6-7 lá thật (4-5 lá kép) thân bắt đầu phát triển mạnh, tốc độ mạnh nhất vào lúc ra hoa rộ. Sự khác biệt của cây đậu tương với cây trồng khác là khi cây ra hoa rộ lại là lúc thân cành phát triển mạnh nhất. Đây là giai đoạn 2 quá trình sinh trưởng sinh dưỡng và sinh trưởng sinh thực cạnh tranh nhau dẫn đến khủng hoảng thiếu dinh dưỡng, cho nên cần phải cung cấp đầy đủ dinh dưỡng trước khi vào thời kỳ này và tạo điều kiện cho bộ rễ phát triển thuận lợi. Trong kỹ thuật chăm sóc ta phải xới vun kết hợp với bón thúc phân cho đậu tương vào giai đoạn 3-5 lá kép, lúc cây có đầy đủ hoa thì sinh trưởng chậm dần rồi dừng hẳn.



Cây đậu tương có 3 loại lá: lá mầm, lá nguyên, lá kép. 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 đi, cho nên trong kỹ thuật trồng đậu tương nên làm đất tơi nhỏ và chọn hạt to cây sẽ mọc khỏe, sinh trưởng tốt. Lá nguyên xuất hiện sau khi cây mọc từ 2-3 ngày và mọc phía trên lá mầm. Lá đơn mọc đối xứng nhau. Lá đơn to màu xanh bóng là 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. Mỗi lá kép có 3 lá chét, có khi 4-5 lá chét. Lá kép mọc so le, lá kép thường có màu xanh tươi khi già biến thành màu vàng nâu. Cũng có giống khi quả chín lá vẫn giữ được màu xanh, những giống này thích hợp trồng làm thức ăn gia súc. Phần lớn trên 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 chống chịu hạn kém nhưng thường cho năng suất cao hơn. Nếu 2 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 lớn 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. Các nhà chọn giống đậu tương đưa ra cơ sở để nâng cao năng suất đậu tương là tăng cường quá trình quang hợp và muốn quang hợp với hiệu quả cao thì phải chọn những cây có bộ lá nhỏ, dày, thể lá đứng và lá có dạng hình trứng. 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 [14]

Hoa đậu tương nhỏ, không hương vị, thuộc loại cánh bướm. 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. Các giống đậu tương có hoa màu trắng

thường có tỷ lệ đầu cao hơn các giống màu tím. Hoa phát sinh ở nách lá, đầu cành và đầu thân. Hoa mọc thành từng chùm, mỗi chùm có từ 1-10 hoa và thường có 3-5 hoa. Hoa đậu tương ra nhiều nhưng tỷ lệ rụng rất cao khoảng 30% có khi lên tới 80% [14]. Hoa đậu tương 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. Đài hoa có màu xanh, nhiều bông. Các cánh hoa vươn ra khỏi lá đài từ ngày hôm trước và việc thụ phấn xảy ra vào sáng ngày hôm sau lúc 8-9 giờ sáng trước khi nhị hoặc hoa chưa nở hoàn toàn. Mùa hè hoa thường nở sớm hơn mùa đông và thời gian nở hoa rất ngắn sáng nở chiều tàn. Hoa đậu tương thường thụ phấn trước khi hoa nở và là cây tự thụ phấn, tỷ lệ giao phấn rất thấp chiếm trung bình 0,5 - 1%. Thời gian bắt đầu ra hoa sớm hay muộn, dài hay ngắn tùy thuộc vào giống và thời tiết khác nhau. Giống chín sớm sau mọc trên dưới 30 ngày đã ra hoa và giống chín muộn 45-50 ngày mới ra hoa. Thời gian ra hoa dài hay ngắn theo giống và theo thời vụ. Có những giống thời gian ra hoa chỉ kéo dài 10-15 ngày. Kết quả nghiên cứu cho thấy thời kỳ hoa rộ thường từ ngày thứ 5 đến ngày thứ 10 sau khi hoa bắt đầu nở. Hoa trong đợt rộ mới tạo quả nhiều, còn trước và sau đợt hoa rộ thì tỷ lệ đậu quả thấp. Điều kiện thích hợp cho sự nở hoa là ở nhiệt độ 25-28°C, ẩm độ không khí 75-80%, ẩm độ đất 70-80%. Căn cứ vào phương thức ra hoa người ta chia các giống đậu tương làm 2 nhóm: (i) Nhóm ra hoa hữu hạn: Thuộc những giống sinh trưởng hữu hạn, hướng ra hoa theo trình tự từ trên xuống dưới và từ ngoài vào trong. Những giống này thường cây thấp ra hoa tập trung, quả và hạt đồng đều. (ii) Nhóm ra hoa vô hạn: Thuộc những giống sinh trưởng vô hạn, có hướng ra hoa theo trình tự từ dưới lên trên và từ trong ra ngoài. Những giống này thường ra hoa rất phân tán, quả chín không tập trung và phẩm chất hạt không đồng đều. Trong thực tế, những giống hoa tập trung nếu gặp điều kiện bất thuận, hoa sẽ rụng nhiều nên thất thu nặng. Còn những giống thời gian ra hoa dài tuy quả chín không tập trung nhưng nếu bị rụng vào một đợt thì hoa sẽ ra tiếp đợt sau nên không thất thu nặng.