

VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM

VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT

..... ☞  ☞

NGUYỄN THỊ PHƯỢNG

**NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA TỪ TRƯỜNG TỚI
HIỆU QUẢ CHUYỂN GEN VÀO ĐẬU TƯƠNG THÔNG
QUA VI KHUẨN *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS***

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

HÀ NỘI, 2015

MỤC LỤC

	Trang
MỞ ĐẦU.....	1
CHƯƠNG I. TỔNG QUAN TÀI LIỆU.....	4
1.1. Giới thiệu chung về đậu tương.....	4
1.1.1. Nguồn gốc và phân loại.....	4
1.1.2. Vai trò.....	4
1.2. Tình hình sản xuất đậu tương trên thế giới và Việt Nam.....	6
1.2.1. Tình hình sản xuất đậu tương trên thế giới	6
1.2.2. Tình hình sản xuất đậu tương ở Việt Nam.....	7
1.3. Từ trường và vai trò của từ trường lên hệ thống sinh học	9
1.3.1. Định nghĩa từ trường	9
1.3.2. Vai trò của từ trường đối với cơ thể sống	10
1.4. Các nghiên cứu ảnh hưởng của từ trường lên quá trình sinh học ở thực vật	11
1.4.1. Ảnh hưởng của từ trường đến sự phát triển của thực vật.....	11
1.4.2. Tác động của từ trường lên sự nảy mầm của hạt	12
1.4.3. Tác dụng của từ trường lên chồi và rễ	14
1.4.4. Ảnh hưởng của từ trường tới quá trình quang hợp	14
1.5. Vai trò của từ trường lên hệ thống nuôi cấy mô thực vật	15
1.6. Chọn tạo giống đậu tương bằng phương pháp chuyển gen.....	15
1.7. Thực trạng nghiên cứu biến nạp gen vào đậu tương.....	20
1.8. Các nghiên cứu về từ trường tại Việt Nam	22
CHƯƠNG 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	23
2.1. Vật liệu và phạm vi nghiên cứu	23
2.1.1. Vật liệu thực vật	23
2.1.2. Vật liệu vi khuẩn	23
2.1.3. Hóa chất và dụng cụ thí nghiệm.....	23
2.1.4. Thiết bị	23
2.2. Địa điểm và thời gian tiến hành	24

2.3. Phương pháp nghiên cứu.....	25
2.3.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của từ trường đều và từ trường không đều lên quá trình sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	25
2.3.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của từ trường đều và từ trường không đều lên khả năng tái sinh của cây đậu tương.....	26
2.3.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của từ trường đều và không đều tới hiệu quả chuyển gen vào đậu tương thông qua vi khuẩn <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	27
2.3.4. Phương pháp đánh giá tính kháng thuốc trừ cỏ Basta của các cây đậu tương chuyển gen trong điều kiện nhà lưới.....	30
2.3.5. Phương pháp tách chiết DNA tổng số.....	30
2.3.6. Phương pháp PCR.....	31
2.3.7. Các chỉ tiêu đánh giá	32
2.3.8. Phương pháp thu thập và xử lý số liệu.....	32
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN.....	33
3.1. Ảnh hưởng của từ trường đều và không đều lên quá trình sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	33
3.1.1. Ảnh hưởng của từ trường đều lên quá trình sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	33
3.1.2. Ảnh hưởng của từ trường không đều lên quá trình sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	35
3.2. Ảnh hưởng của từ trường đều và không đều lên khả năng tái sinh của đậu tương.....	37
3.2.1. Ảnh hưởng của từ trường đều lên khả năng tái sinh của đậu tương	37
3.2.2. Ảnh hưởng của từ trường không đều lên khả năng tái sinh của đậu tương	39
3.3. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của từ trường đều và không đều đến quá trình chuyển gen vào đậu tương	41
3.3.1. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của từ trường đều đến quá trình chuyển gen vào đậu tương.....	41
3.3.2. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của từ trường không đều đến quá trình chuyển gen vào đậu tương	44
3.4. Phân tích hiệu quả tiếp nhận gen của đậu tương dưới tác động của từ trường bằng phương pháp PCR	51

3.4.1. Tách chiết và kiểm tra DNA tổng số từ các dòng đậu tương chuyển gen	51
3.4.2. Phân tích sự có mặt của gen <i>bar</i> trong các dòng đậu tương chuyển gen bằng kỹ thuật PCR	51
CHƯƠNG 4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	54
4.1. Kết luận	54
4.2. Kiến nghị	54
TÀI LIỆU THAM KHẢO	55
PHỤ LỤC: BẢNG THÀNH PHẦN MÔI TRƯỜNG	

MỞ ĐẦU

Cây đậu tương (*Glycine max* L. Merr.) là loại cây trồng ngắn ngày, có giá trị kinh tế cao. Hạt đậu tương được dùng làm nguồn thực ăn giàu đạm cho con người và là nguồn nguyên liệu quan trọng cho nhiều ngành công nghiệp chế biến [2]. Ngoài ra, đậu tương rất dễ canh tác, có khả năng thích nghi với nhiều vùng sinh thái, khí hậu khác nhau vì vậy đậu tương được trồng ở nhiều quốc gia trên thế giới.

Biến đổi khí hậu toàn cầu ảnh hưởng xấu đến tình hình sản xuất đậu tương không chỉ ở Việt Nam mà ngay cả các quốc gia sản xuất đậu tương hàng đầu thế giới. Việc nghiên cứu tạo giống đậu tương có khả năng thích ứng với điều kiện biến đổi khí hậu, trong đó có chọn tạo giống đậu tương bằng công nghệ gen là hướng nghiên cứu rất được quan tâm và đã đạt được nhiều thành tựu.

Từ trường trái đất (5.10^{-6} Tesla) do hoạt động tự quay của Trái Đất sinh ra và có ảnh hưởng đến đời sống của mọi sinh vật. Khoa học phát triển đã nghiên cứu và ứng dụng từ trường nhân tạo phục vụ đời sống con người. Từ trường được sớm ứng dụng trong y học và phát triển nhanh chóng trên các lĩnh vực chẩn đoán, điều trị, dược học... để chăm sóc sức khỏe cho con người [68]. Sử dụng cốc từ có tác dụng từ hóa nước, đẩy mạnh quá trình trao đổi chất, đào thải độc tố trong cơ thể người uống tốt hơn. Từ trường còn có tác dụng ngăn chặn quá trình loãng xương hay gãy xương chậm liền do sự hình thành cấu trúc xương chịu ảnh hưởng của lực từ [16]. Ngoài ra, từ trường còn có nhiều ứng dụng khác, như làm giảm đau cho người bệnh bằng việc tác động vào các dây thần kinh, hạ huyết áp, ăn không tiêu...[113]. Trong nông nghiệp, từ trường nhân tạo đã được ứng dụng trong việc tạo nguồn nước sạch bằng từ hoá nước dùng trong chăn nuôi, thủy sản, hoạt hoá dinh dưỡng tưới bón cho cây trồng, kích thích sinh trưởng cây trồng trong nuôi cấy mô... Các nghiên cứu gần đây nhất tiến hành tại Viện Di truyền Nông nghiệp đã phát hiện tác dụng của từ trường có thể tăng hiệu quả nuôi cấy bao phấn ngô lên 3 lần [5]. Trên nguyên lý tác động tích cực của từ trường lên cơ thể sinh vật, nhiều tác giả đã ứng dụng từ trường nhân tạo nhằm kích thích tăng trưởng cây trồng trong nuôi cấy mô các cây như chuối, hồng, khoai tây, thuốc lá, lúa mì, đậu đỗ, ngô ...[14], [15], [20]. Hay xử lý hạt giống bằng từ trường để tăng sức nảy mầm, xử lý từ nhằm tăng hoạt tính của

nước trước khi tưới đã tăng cường sinh trưởng của cây trồng. Hầu hết các kết quả nghiên cứu cho thấy từ trường đã làm tăng tốc độ sinh trưởng của cây lên rõ rệt như tăng chiều cao thân, chiều dài rễ, tăng tỉ lệ tạo chồi, cụm chồi phát sinh, số rễ tạo thành ở *Paulownia* [15], [106]; *Phalaenosis* [97] , [98] ; *Prunus martima* [104], *Cybidium* và *Spathiphyllum* [99] , [100] và tăng hàm lượng diệp lục trong lá. Từ trường nhân tạo tác động kích thích hoặc kìm hãm sinh trưởng của thực vật, thực chất là ảnh hưởng đến quá trình trao đổi chất ở tế bào mà bản chất là tác động lên điện tích trong tế bào sinh vật.

Từ trường có tác dụng tốt tới sức khỏe, làm tăng hiệu quả quá trình nuôi cấy mô thông qua quá trình phân chia của tế bào thực vật. Từ trường cũng có ảnh hưởng tích cực tới sự sinh trưởng của vi khuẩn từ đó từ trường có thể ảnh hưởng tích cực tới quá trình biến nạp gen và tần số biến nạp gen của vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* vào mô thực vật.

Ở Việt Nam, trong những năm gần đây nghiên cứu chuyển gen ở đậu tương đã được tiếp cận triển khai ở một số phòng thí nghiệm, bước đầu cho kết quả [7], [8]. Tuy nhiên, hiệu quả chuyển gen thu được vẫn thấp, do vậy việc cải tiến các nhân tố nhằm tăng hiệu quả của quá trình biến nạp gen là cần thiết để đạt được tỉ lệ gen chuyển thành công cao vào cây đậu tương. Xuất phát từ yêu cầu thực tiễn và các nghiên cứu đã tiến hành, chúng tôi thực hiện đề tài “**Nghiên cứu ảnh hưởng của từ trường tới hiệu quả chuyển gen vào đậu tương thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*”**.”

Mục tiêu đề tài

- Xây dựng được hệ thống từ trường nhằm nâng cao hiệu quả chuyển gen vào đậu tương thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*.

Nội dung nghiên cứu

Nội dung 1: Nghiên cứu ảnh hưởng của từ trường đều và từ trường không đều lên quá trình sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* lên quá trình sinh trưởng và phát triển của vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*

Nội dung 2: Nghiên cứu ảnh hưởng của từ trường đều và từ trường không đều lên khả năng tái sinh của đậu tương

Nội dung 3: Nghiên cứu ảnh hưởng của hệ thống từ trường đều và từ trường không đều tới hiệu quả chuyển gen vào đậu tương thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*

Nội dung 4: Phân tích các cây chuyển gen bằng kỹ thuật PCR

CHƯƠNG I. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. Giới thiệu chung về đậu tương

1.1.1. Nguồn gốc và phân loại

Đậu tương được biết đến là “Ông hoàng của những cây họ đậu” với hơn 40% protein và 20% dầu. Các bằng chứng về lịch sử, địa lý, khảo cổ học chỉ ra rằng đậu tương có nguồn gốc từ Trung Quốc vào khoảng thế kỉ XVII trước công nguyên. Cây đậu tương được truyền bá sang Nhật Bản vào khoảng thế kỉ thứ VIII, du nhập vào nhiều nước Châu Á khác như: Indonesia, Philippin, Thái Lan, Ấn Độ, Việt Nam,... vài thế kỷ sau đó. Cây đậu tương được trồng ở Châu Âu vào thế kỷ XVII và ở Hoa Kỳ thế kỷ XVIII. Đậu tương là nguồn dầu thực vật và protein lớn nhất trên thế giới với quy mô canh tác lớn và tập trung ở vài quốc gia như Mỹ, Argentina, Brazil, Canada, Trung Quốc, Ấn Độ và Paraguay.

Theo hệ thống phân loại dựa vào đặc điểm về hình thái, sự phân bố địa lý và số lượng nhiễm sắc thể do Hymowitz và Newell (1984), đậu tương hay đỗ tương, đậu nành có tên khoa học là *Glycine max* L. Merr. Đậu tương thuộc chi *Glycine*, phân họ Leguminosae, họ Đậu Fabaceae, bộ Fabales. Đây là loại cây trồng đem lại lợi ích kinh tế to lớn nhất trên thế giới hiện nay [2] , [3].

1.1.2. Vai trò

* Giá trị dinh dưỡng

Đậu tương là một trong những cây trồng thương mại của nhiều nước. Hạt đậu tương thành phần dinh dưỡng cao với protein chiếm khoảng 40-50%, lipit dao động từ 12-24%, carbohydrate từ 10-16%; Trong khi đó protein của gạo tẻ chỉ đạt 6,2-12%; ngô là 9,8-13,2%; thịt bò là 21%; thịt gà là 20%; cá là 17-20%; trứng là 13-14,8%. Như vậy, protein của đậu tương có phẩm chất tốt nhất trong các protein có nguồn gốc động vật, thực vật khác [6].

Bên cạnh hàm lượng lớn về protein và lipit, hạt đậu tương còn chứa nhiều loại axit amin trong đó có 8 axit amin không thay thế như: arginin, histidin, lysin,

tryptophan... Hàm lượng của các axit amin có chứa lưu huỳnh như methionin, sixtin trong đỗ tương rất gần với hàm lượng của các chất này ở trứng. Điều này cho thấy đây là loại hạt mà có đầy đủ các loại axit amin cần thiết. Đậu tương là cây cung cấp dầu thực vật quan trọng nhất thế giới. Hạt đậu tương có chứa hàm lượng dầu béo cao hơn các loại đậu khác. Ngoài ra, trong hạt đậu tương còn chứa nhiều loại vitamin đặc biệt là vitamin B₁, B₂, PP, A, K, C... (vitamin C có nhiều trong giá đậu tương) [3]. Hạt đậu tương có chứa nhiều hợp chất phenolic như axit chlorogenic, axit caffeic, axit ferulic acid p-coumaric. Đây là những chất chống oxy hóa tác dụng có lợi cho sức khỏe con người.

** Giá trị về nông nghiệp*

Đậu tương là nguồn thức ăn cho chăn nuôi rất tốt. Chúng được sử dụng làm thức ăn tươi (thân, lá đậu tương) cho đại gia súc, thức ăn khô (nghiên tổng hợp) cho gia cầm. Khô dầu đậu tương có hàm lượng dinh dưỡng khá cao trong đó N chiếm 6,2%; P₂O₅ chiếm 0,7%; K₂O chiếm 2,4%) [2] .

Trong trồng trọt, đậu tương là cây trồng luân canh cải tạo đất, chống xói mòn. Thân, lá đậu tương có thể sử dụng làm phân bón, thức ăn cho chăn nuôi. Rễ đậu tương có nốt sần hoạt động cung cấp đạm cho cây và cải tạo đất [3].

** Giá trị về mặt công nghiệp*

Bên cạnh hàm lượng dinh dưỡng của đậu tương thì chính giá trị protein của đậu tương đã mở ra con đường sản xuất sản phẩm mới và nâng cao chất lượng sản phẩm. Đậu tương là nguyên liệu cho các ngành công nghiệp chế biến như: thực phẩm, thức ăn chăn nuôi, công nghệ ép dầu, cao su chất dẻo, xà phòng, tơ nhân tạo, dầu... Hiện nay, trên thế giới đậu tương chiếm khoảng 50% tổng sản lượng sử dụng cho công nghiệp ép dầu. Dầu đậu tương có rất nhiều ưu điểm là dung dịch có màu vàng sáng, có hệ số đồng hoá cao (98%). Dầu đậu tương có nhiệt độ đông đặc thấp (-15⁰C; -18⁰C) có tác dụng làm bôi trơn máy móc động cơ, chỉ số xà phòng hoá cao (185 – 195 mg) sử dụng để thủy phân 1 g dầu, chỉ số iốt cao (122 – 150mg) dùng để đo độ bão hoà của axit trong dầu. Ngoài ra, đậu tương còn được chế biến thành nhiều sản phẩm khác nhau như làm nền, xà phòng, ni lông... [3].

1.2. Tình hình sản xuất đậu tương trên thế giới và Việt Nam

1.2.1. Tình hình sản xuất đậu tương trên thế giới

Cây đậu tương là một cây trồng có khả năng thích ứng rộng nên được phân bố ở khắp các châu lục và được trồng ở nhiều nước trên thế giới, tập trung ở các nước có 48⁰ vĩ độ Bắc đến 30⁰ vĩ độ Nam. Hiện nay, phần lớn đậu tương trồng trên thế giới là các giống biến đổi gen. Theo báo cáo hàng năm của ISAAA, sau 19 năm phát triển (kể từ năm 1996), các loại cây trồng chuyển gen được thương mại hóa ngày càng tăng qua các năm. Tính riêng năm 2014, cây trồng biến đổi gen được trồng rộng rãi tại 28 nước với tổng diện tích khoảng 181,5 triệu ha (số nước trồng cây biến đổi gen tăng 4 lần, diện tích tăng hơn 100 lần so với năm 1996), tỷ lệ tăng trưởng hàng năm khoảng 3 – 4%. Trong đó, Mỹ là quốc gia đứng đầu về diện tích cây trồng chuyển gen trên thế giới (73,1 triệu ha, chiếm 40%), tiếp đến là Brazil (42,2 triệu ha), Argentina (24,3 triệu ha), Ấn Độ (11,6 triệu ha), Canada (11,6 triệu ha). Trong số các cây trồng biến đổi gen, đậu tương luôn là cây được nghiên cứu, trồng thử nghiệm và thương mại hóa với quy mô và diện tích lớn. Trong tổng số 113,05 triệu ha đậu tương, giống chuyển gen chiếm 85% diện tích [54]. Đây là sự đóng góp to lớn của các nhà chọn tạo giống đậu tương thế giới góp phần vào sự phát triển của ngành nông nghiệp toàn cầu. Thể hiện tầm quan trọng của cây đậu tương đối với mỗi quốc gia. Theo thống kê của Tổ chức Lương thực và Nông nghiệp Liên hiệp Quốc và báo cáo hàng năm của ISAAA (2014), diện tích đậu tương trên thế giới tăng khoảng 9,23 triệu ha so với năm 2010 được thể hiện rõ ở bảng 1.1.

Bảng 1.1. Tình hình sản xuất đậu tương trên thế giới trong những năm gần đây

Năm	Diện tích gieo trồng (triệu ha)	Năng suất (Tạ/ha)	Sản lượng (triệu tấn)
2010	102,81	25,79	265,12
2011	103,82	25,23	261,89
2012	105,02	22,95	240,97
2013	111,54	24,75	276,03
2014	113,05	25,11	283,873

(Nguồn FAOSTAT, 2015 và ISAAA, 2014)