

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

NGUYỄN THÙY GIANG

**ĐẶC ĐIỂM CỦA GEN DREB5
Ở HAI GIỐNG ĐẬU TƯƠNG CÚC LÔNG
PHÚ BÌNH VÀ VÀNG NGÂN SƠN**

LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

THÁI NGUYÊN – 2011

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

NGUYỄN THÙY GIANG

**ĐẶC ĐIỂM CỦA GEN DREB5
Ở HAI GIỐNG ĐẬU TƯƠNG CÚC LÔNG
PHÚ BÌNH VÀ VÀNG NGÂN SƠN**

Chuyên ngành: Công nghệ sinh học

Mã số: 60 42 80

LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học: PGS.TS. CHU HOÀNG MẬU

THÁI NGUYÊN – 2011

MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Đậu tương (*Glycine max* (L.) Merrill) là một trong những cây lương thực có vị trí quan trọng trong cơ cấu cây trồng nông nghiệp của thế giới nói chung và của Việt Nam nói riêng. Trong các cây họ đậu, đậu tương được coi là loại cây trồng chiến lược của nhiều quốc gia trên thế giới, do có tác dụng nhiều mặt, có hiệu quả kinh tế cao, có thời gian sinh trưởng ngắn lại dễ trồng. Sản phẩm từ cây đậu tương được sử dụng cho người và gia súc như dùng trực tiếp hạt thô hoặc chế biến thành đậu phụ, ép thành dầu đậu nành, nước tương, làm bánh kẹo, sữa đậu nành... đáp ứng nhu cầu đạm trong khẩu phần ăn hàng ngày của người cũng như gia súc [2].

Hạt đậu tương có từ 32% đến 56% protein và từ 12% đến 25% lipit, từ 10-15% glucit và chứa nhiều loại vitamin...[2]. Gần đây các nhà khoa học đã nghiên cứu và phát hiện đậu tương có vai trò chữa và điều trị bệnh nan y như ung thư, tim mạch... Đậu tương còn có thể giải quyết một phần vấn đề hết sức nóng bỏng hiện nay trên thế giới là năng lượng từ các sản phẩm của nó. Ngoài ra, đậu tương còn có tác dụng cải tạo đất nhờ vi khuẩn cố định đạm chứa trong các nốt sần ở rễ. Với những giá trị to lớn đó, cây đậu tương được trồng phổ biến ở nhiều nơi từ 55° vĩ Bắc đến 55° vĩ Nam, từ vùng thấp hơn mực nước biển đến vùng cao trên 2000m so với mực nước biển với diện tích đạt khoảng hơn 74,7 triệu ha. Hiện nay, ở Việt Nam, cây đậu tương chiếm một vị trí rất quan trọng trong nền nông nghiệp nên được gieo trồng ở cả 7 vùng nông nghiệp trên cả nước với mục đích giải quyết vấn đề thiếu protein cho người và gia súc, xuất khẩu và cải tạo đất.

Trên thế giới, đậu tương được sản xuất trên quy mô lớn và phát triển mạnh mẽ nhất ở các nước Nam Mỹ như Brazil, Argentina, Canada... nhưng

lớn nhất phải kể đến Mỹ và gần đây là Trung Quốc. Hàng năm họ sản xuất và đưa ra thị trường thế giới hàng triệu tấn/năm, điều này đã góp phần giải quyết các vấn đề nóng của thế giới đó như năng lượng, ô nhiễm...

Nước ta có hệ sinh thái rất đa dạng, khí hậu giữa các vùng miền lại không giống nhau. Địa hình có đến 3/4 là đồi núi thường có mùa khô hanh ở miền bắc, mùa khô nóng ở Tây Nguyên... Những năm gần đây diễn biến khí hậu ngày càng phức tạp, lượng mưa phân bố không đều giữa các vùng và giữa các thời kỳ trong năm nên hạn hán và nắng nóng kéo dài. Tình trạng hạn hán ảnh hưởng đến sản xuất đậu tương không chỉ ở Việt Nam mà ngay cả những nước sản xuất đậu tương hàng đầu thế giới như Argentina. Thống kê cho thấy, sản lượng đậu tương của Argentina vào vụ mùa năm 2009 giảm từ 34,5 triệu tấn so với cùng thời điểm năm 2008 là 46,2 triệu tấn. Ở Việt Nam, tình hình thiếu nước trầm trọng tại các địa phương làm cho sản lượng đậu tương của năm 2009 giảm xuống chỉ còn 213,6 nghìn tấn so với năm 2007 là 275,2 nghìn tấn và năm 2008 là 267,6 nghìn tấn [33]. Đậu tương là cây tương đối mẫn cảm với điều kiện ngoại cảnh và thuộc vào nhóm cây chịu hạn kém. Chính vì vậy nghiên cứu tạo giống đậu tương có kiểu gen chống chịu hạn và có khả năng sống trong điều kiện bất lợi về nước đang là hướng nghiên cứu rất được quan tâm của các nhà chọn giống [6], [7]. Cho đến nay ở Việt Nam đã có một số công trình nghiên cứu tìm hiểu cơ sở phân tử của đặc tính chịu hạn ở cây đậu tương (Trần Thị Phương Liên, 1999 [5]; Chu Hoàng Mậu, 2001 [7]; Hoàng Thị Thu Yên và đtg 2003 [10]), kết quả nghiên cứu của các công trình này đã chỉ ra rằng, những thông tin về gen và protein liên quan đến tính chịu hạn của cây đậu tương là cơ sở cho việc tìm kiếm các ứng dụng nhằm nâng cao khả năng chịu hạn của cây đậu tương.

Quá trình phiên mã của nhóm gen chịu hạn chịu tác động của các yếu tố điều khiển quá trình phiên mã, trong đó có nhân tố DREB. Nghiên cứu và ứng

dụng protein DREB đã thành công trên các đối tượng như cây khoai tây, cà chua, hoa cúc, lúa mì ..., nhưng đối với cây đậu tương các công trình nghiên cứu về gen DREB còn ít được công bố. Vì vậy, nghiên cứu nhân tố phiên mã theo hướng tăng cường khả năng biểu hiện của nhóm gen liên quan đến đặc tính chịu hạn của cây đậu tương được chúng tôi quan tâm nghiên cứu. Từ những lí do trên chúng tôi tiến hành đề tài luận văn thạc sĩ là: **“Đặc điểm của gen DREB5 ở hai giống đậu tương Cúc lông Phú Bình và Vàng Ngân Sơn”**.

2. Mục tiêu đề tài

Xác định được sự sai khác trong trình tự gen DREB5 của hai giống đậu tương nghiên cứu.

3. Nội dung nghiên cứu

- 3.1. Thu thập thông tin về gen DREB5 và thành phần phản ứng để nhân gen DREB5;
- 3.2. Nhân bản gen DREB5 từ DNA hệ gen của cây đậu tương bằng kỹ thuật PCR;
- 3.3. Tách dòng và đọc trình tự gen DREB5 của hai giống đậu tương Cúc lông Phú Bình (CPB) và Vàng Ngân Sơn (VNS);
- 3.4. So sánh trình tự gen DREB5, trình tự amino acid giữa hai giống đậu tương CPB, VNS và so sánh với các trình tự DREB5 đã công bố trên Ngân hàng gen quốc tế.

Chương 1

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. CÂY ĐẬU TƯƠNG

1.1.1. Đặc điểm nông sinh học và thành phần hoá sinh hạt đậu tương

Đậu tương (*Glycine max* (L.) Merrill), có bộ nhiễm sắc thể $2n = 40$, là loại cây trồng thuộc họ đậu (*Fabaceae*), họ phụ cánh bướm (*Papilionoidea*) có nguồn gốc từ các tỉnh phía Bắc và Đông Bắc Trung Quốc, các vùng kế cận của Cộng hòa Liên bang Nga, Triều Tiên và Nhật Bản. Các giống đậu địa phương của nước ta hiện nay được du nhập từ Trung Quốc đã từ lâu đời [2].

Cây đậu tương là cây thân thảo, ít phân cành dạng bụi cây đậu tương có các bộ phận chính là rễ, thân, lá, hoa và quả. Trong đó lá đậu tương là lá kép với 3 lá chét, nhưng đôi khi cũng có 4 – 5 lá chét. Hoa màu trắng hay tím, quả thẳng hay quả cong đều có nhiều lông. Vỏ của hạt đậu tương có màu nâu hoặc đen, vàng, xanh. Khối lượng hạt rất đa dạng từ 200 – 400mg/hạt. Cây đậu tương có 2 đặc tính sinh trưởng: sinh trưởng hữu hạn và sinh trưởng vô hạn; thời gian sinh trưởng có 3 loại: chín sớm (75 – 85 ngày), trung bình (80 – 100 ngày), muộn (110 – 120 ngày). Thời gian sinh trưởng là một yếu tố rất quan trọng để lựa chọn cây trồng luân canh xen vụ. Một đặc điểm nổi bật là ở rễ cây đậu tương thường có nốt sần chứa vi khuẩn có khả năng cố định nitơ tự do, cho nên trồng cây đậu tương còn có tác dụng cải tạo đất. Các công trình nghiên cứu cho thấy những giống có khả năng cộng sinh và có đủ nốt sần thường làm cho lượng protein cao. Đậu tương là cây tương đối miễn cảm với điều kiện ngoại cảnh. Trong tập đoàn giống đậu tương có những giống chỉ trồng vào vụ hè, có những giống chỉ trồng vào vụ đông [2].

Cây đậu tương cùng với các cây trồng khác như bông, lạc, hướng dương, cải dầu, dưa và cò là 8 loại cây lấy dầu quan trọng được quan tâm,

trong đó, đậu tương là cây trồng lấy hạt, cung cấp dầu quan trọng bậc nhất trong các cây lấy dầu trên. Hiện nay, thông kê của FAO cho thấy từ năm 1980 trở lại đây sản lượng đậu tương trên thế giới đã tăng lên 2 lần chủ yếu nhờ vào tăng diện tích và năng suất. Trong vòng 20 năm qua diện tích gieo trồng tăng nhanh, năng suất bình quân khá cao 23 tạ/ha. Các nước sản xuất đậu tương đứng đầu thế giới: Mỹ, Brazil, Argentina và Trung Quốc chiếm khoảng 90 – 95% tổng sản lượng đậu tương trên thế giới [33].

Hiện nay, ở Việt Nam cây đậu tương chiếm một vị trí rất quan trọng trong nền sản xuất nông nghiệp, đặc biệt ở những vùng nông thôn nghèo, kinh tế chưa phát triển. Nhưng ngành sản xuất đậu tương ở nước ta chưa được đầu tư, năng suất còn thấp, do vậy nghiên cứu cải tiến các đặc điểm nông sinh học của các giống địa phương và tạo giống mới có năng suất cao, thích nghi với điều kiện sinh thái ở những vùng khác nhau bằng phương pháp truyền thống kết hợp với kỹ thuật hiện đại sẽ đáp ứng được yêu cầu của thực tiễn đặt ra và đó là chiến lược quan trọng về sự phát triển cây đậu đỗ của nước ta

Trong hạt đậu tương, protein chiếm từ 30 – 56%, lipit 12- 25%, glucit 20%; có các muối khoáng Ca, Mg, K, P, Na, S, Fe, các vitamin A, B1, B2, D, E, F, các men, sáp, nhựa, cellulose. Ngoài ra, đậu tương còn có đầy đủ các amino acid cơ bản, isoleucin, leucin, lysin, methionin, phenylalanin, tryptophan, valin [2].

Protein là thành phần chủ yếu trong hạt chiếm từ 30 - 56%, trên thực tế cho thấy kiểu gen và điều kiện canh tác làm ảnh hưởng tới hàm lượng protein nhưng chúng vẫn chứa hàm lượng protein lớn hơn các loài thực vật khác [2]. Protein được dự trữ trong các bào quan, có chức năng cung cấp nguồn amino acid và nitơ cho quá trình nảy mầm của hạt, protein dự trữ chủ yếu trong hạt đậu tương là albumin và globulin. Dựa vào hệ số lắng người ta chia protein

của hạt đậu tương thành 3 loại: legumin, vixilin, enzym và chất ức chế enzym có bản chất protein. Trong hạt đậu tương protein dự trữ chiếm tới 70%, ngoài ra là các enzym, các chất ức chế proteaza và lectin. Thành phần của protein gồm có albumin (9,5%), globulin tan trong nước (75,8%), globulin tan trong NaCl chiếm 3%, glutelin tan trong NaOH 0,2M chiếm 11,7% [5]. Protein của cây họ đậu nói chung, cây đậu tương nói riêng được coi là chất lượng tốt nhất trong các loại protein thực vật, chúng chứa tất cả các amino acid không thay thế cần thiết cho cơ thể người và động vật, tỷ lệ lyzin rất cao, hàm lượng các amino acid chứa gốc SH như methyonin, systeinein thấp [5], [7], [29].

Hàm lượng lipid trong hạt đậu tương khá cao chiếm từ 12 – 25% khối lượng khô, trong đó hàm lượng axit béo no thấp, khoảng 13% không có cholestrol, 30% là các axit béo không no một nối đôi. Lượng axit không no cần thiết: axit linoleic 50%, và đặc biệt có 7% axit α - linoleic là nguồn cung cấp chuỗi mạch dài omega 3 quan trọng cho cơ thể như DHA (Docosa Hexaenoic Acid) và EPA (Eicosa Pentaenoic Acid). Chất lượng lipid ở hạt đậu tương rất tốt, vì vậy nó được sử dụng rộng rãi trong công nghiệp chế biến thực phẩm. Hạt đậu tương còn có vitamin tan trong lipid, đặc biệt là vitamin E=200mg/100glipit [2], ngoài ra trong hạt đậu tương còn chứa một số chất khác như cacbon hydrat, muối khoáng, axit nucleic, kích thích sinh trưởng.

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

Trên thế giới: Với những giá trị kinh tế và sử dụng của cây đậu tương nên đây được xem là một trong những loại cây trồng chiến lược ở nhiều quốc gia với vị trí chỉ đứng sau lúa, ngô và lúa mì. Do có khả năng thích nghi rộng với các điều kiện khí hậu và sinh thái khác nhau nên đậu tương được trồng rộng rãi trên cả năm châu lục, tập trung nhiều nhất ở Châu Mỹ, tiếp đến là Châu Á. Theo thống kê của Tổ chức Nông nghiệp và Lương thực Liên hiệp quốc, diện

tích gieo trồng đậu tương trên thế giới tăng khoảng 3,6 triệu ha trong vòng 4 năm trở lại đây (năm 2006 là 95,2 triệu ha và năm 2009 là 98,8 triệu ha) [33].

Trong đó, Hoa Kỳ là quốc gia có diện tích gieo trồng cây đậu tương lớn nhất là 30,91 triệu ha tiếp đến là quốc gia Brazil (21,76 triệu ha) và Argentina (16,77 triệu ha) vào năm 2009 (Bảng 1.1) so với Việt Nam chỉ là 0,15 triệu ha.

Bảng 1.1. Diện tích sản xuất đậu tương ở một số quốc gia trên thế giới

Quốc gia	Diện tích thu hoạch (triệu ha)*			
	Năm 2006	Năm 2007	Năm 2008	Năm 2009
Argentina	15,13	15,98	16,39	16,77
Brazil	22,05	20,57	21,06	21,76
Trung Quốc	9,30	8,75	9,13	8,80
Ấn Độ	8,33	8,88	9,52	9,60
Indonesia	0,58	0,46	0,59	0,72
Thailand	0,14	0,13	0,12	0,11
Hoa Kỳ	30,19	25,96	30,22	30,91
Việt Nam	0,19	0,19	0,19	0,15

* Theo số liệu thống kê của Tổ chức Lương thực và Nông nghiệp Liên hiệp quốc (FAO) [33].

Mặc dù diện tích gieo trồng cây đậu tương tăng lên đáng kể trong các năm trở lại đây nhưng sản lượng đậu tương của cả thế giới lại có những biến động khác nhau giữa các năm. Năm 2006 sản xuất đậu tương của cả thế giới đạt 221,9 triệu tấn, năm 2007 giảm xuống còn 219,5 triệu tấn, tăng lên vào năm 2008 là 230,5 triệu tấn nhưng năm 2009 chỉ còn 222,2 triệu tấn. Năm 2009, Hoa Kỳ là quốc gia sản xuất đậu tương nhiều nhất thế giới với 91,42 triệu tấn, tiếp theo là Brazil với 56,96 triệu tấn và Argentina là 30,99 triệu tấn [33] (Bảng 1.2).

Bảng 1.2. Sản lượng sản xuất đậu tương ở một số quốc gia trên thế giới

Quốc gia	Sản lượng (triệu tấn)*			
	Năm 2006	Năm 2007	Năm 2008	Năm 2009
Argentina	40,54	47,48	46,24	30,99
Brazil	52,46	57,86	59,24	56,96
Trung Quốc	15,50	12,73	15,55	14,50
Ấn Độ	8,86	10,97	9,91	10,22
Indonesia	0,75	0,59	0,78	0,97
Thailan	0,21	0,20	0,19	0,19
Hoa Kỳ	87,00	72,86	80,75	91,42
Việt Nam	0,26	0,28	0,27	0,21

* Theo số liệu thống kê của Tổ chức Lương thực và Nông nghiệp Liên hiệp quốc (FAO) [33].

Trong bốn năm trở lại đây năng suất cao nhất đạt được vào năm 2007 là 24,3 tạ/ha và thấp nhất là năm 2009 là 22,4 tạ/ha. Trong số các quốc gia trồng cây đậu tương hàng đầu thế giới chỉ duy nhất Hoa Kỳ vẫn duy trì được năng suất cây đậu tương thậm chí có phần tăng vào năm 2009 so với các năm 2006, 2007 và 2008 (Bảng 1.3). Argentina là nước có năng suất đậu tương giảm mạnh nhất vào năm 2009 chỉ còn 18,48 tạ/ha so với các năm trước trung bình đạt khoảng 27 tạ/ha (Bảng 1.3).