

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 VÂN 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 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 đại 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 chum hoa nào giữ vai trò chủ yếu cung cấp dinh dưỡng cho chum 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 chum 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 kì 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 kì này chính là thời kì 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 kì 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, pheny lalanin, 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%,  $P_2O_5$ : 0,7%,  $K_2O$ : 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  $-15^{\circ}C$  đến  $18^{\circ}C$ . 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



gieo trồng tại một số địa phương. Diện tích và sản lượng trồng cây đậu tương biến đổi gen (cây đậu tương công nghệ sinh học) không ngừng tăng. Cụ thể trong năm 2009 vừa qua, diện tích trồng đậu tương CNSH chiếm tới trên 75% trong tổng diện tích 90 triệu héc-ta trồng đậu tương trên toàn thế giới.

Ở Việt nam, theo số liệu thống kê chính thức tháng 3/ 2013, quy mô sản xuất đậu tương còn tương đối nhỏ lẻ và tiếp tục không đáp ứng được nhu cầu tiêu thụ trong nước. Bộ NN&PTNT cũng đã phê duyệt đưa 3 loại cây là ngô, bông và đậu tương để trồng cây biến đổi gen trên các cánh đồng thử nghiệm.

Theo số liệu thống kê chính thức, đậu tương đang được trồng tại 25 trong số 63 tỉnh thành cả nước, với khoảng 65% tại các khu vực phía Bắc và 35% tại các khu vực phía Nam. Đầu năm 2012, Thủ tướng Chính phủ cũng đã phê duyệt Quy hoạch tổng thể phát triển sản xuất ngành nông nghiệp đến năm 2020 và tầm nhìn đến năm 2030. Theo đó, diện tích đất quy hoạch đậu tương khoảng 100 ngàn ha, tận dụng tăng vụ trên đất lúa để năm 2020 diện tích gieo trồng khoảng 350 ngàn ha, sản lượng 700 ngàn tấn; vùng sản xuất chính là đồng bằng sông Hồng, trung du miền núi phía Bắc, Tây Nguyên.

Như vậy không chỉ ở Việt Nam mà cả thế giới đang quan tâm đến trồng các giống cây biến đổi gen trong đó có cây đậu tương biến đổi gen thích nghi được sự biến đổi của khí hậu phù hợp với điều kiện sinh thái đáp ứng yêu cầu thực tiễn.

## **1.2. TÍNH CHỊU HẠN VÀ SỰ PHÁT TRIỂN BỘ RỄ CỦA CÂY ĐẬU TƯƠNG**

### **1.2.1. Hạn và tác động của hạn đến thực vật**



Hạn là nguyên nhân chính của sự mất mùa và làm giảm năng suất cây trồng. Hạn là khái niệm dùng để chỉ sự thiếu nước của thực vật do môi trường gây nên làm ảnh hưởng đến sinh trưởng và phát triển của thực vật. Có 2 loại hạn: hạn thực và hạn sinh lý.

Hạn thực do thiếu nước trong môi trường gây nên nhưng cũng có loại hạn sinh lý là loại hạn không phải do môi trường thiếu nước, mà do cây không hút được nước trong môi trường có nhiệt độ thấp, do nồng độ dung dịch môi trường quá cao. Khi hạn cây bị stress nước gây nên hiện tượng co nguyên sinh và làm cho cây bị héo. Khi thiếu nước do hạn hạn sự cung cấp nước cho rễ không đủ trong đêm để thủy hoá các mô đã bị thiếu nước ban ngày, các lông hút bị tổn thương lớp ngoài vùng vỏ bị phủ suberin... đã làm giảm áp suất rễ để đẩy cột nước lên trong mạch gỗ. Đặc biệt khi thiếu nước sẽ hình thành nhiều bọt khí trong mạch gỗ phá vỡ tính liên tục của cột nước nên cột nước trong mạch gỗ không được đẩy lên liên tục [12].

Khi thiếu nước tăng trưởng của lá và quang hợp đều giảm nhưng quang hợp giảm ít hơn so với giảm tăng trưởng lá. Điều này khiến cho phần lớn sản phẩm quang hợp được chuyển xuống rễ làm cho bộ rễ phát triển mạnh. Mặt khác khi thiếu nước lớp đất mặt thường khô trước và cứng nên rễ thường có khuynh hướng phát triển theo chiều sâu. Như vậy việc phát triển bộ rễ là hình thức thích nghi với hạn.

Khi cây bị hạn, trong tế bào các gen hoạt động tổng hợp các sản phẩm tham gia vào quá trình giữ nước của tế bào, đó là các chất thẩm thấu, các enzyme, môi giới phân tử. Hai cơ chế chính tác động đến tính chịu hạn của cây đậu tương là điều chỉnh áp suất thẩm thấu (ASTT) và sự phát triển của bộ rễ [7], [8], [11].



Một trong những đáp ứng ở mức độ hóa sinh thường thấy ở thực vật khi cây gặp tình trạng khan hiếm về nước đó là khả năng điều chỉnh áp suất thẩm thấu trong tế bào. Áp suất thẩm thấu được định nghĩa là sự tích lũy chủ động các chất trao đổi trong mô, tế bào của thực vật để duy trì sức căng của tế bào và mô khi lượng nước bên ngoài tế bào giảm. Áp suất thẩm thấu có thể duy trì cường độ thoát hơi nước của khí khổng và quá trình quang hợp trong các trường hợp thế năng nước thấp, làm chậm quá trình ứ lá, giảm quá trình héo lá, kích thích rễ phát triển và tăng cường khả năng hút nước từ đất.

Một đặc tính quan trọng của tế bào khi mất nước do nóng hạn đó là nhờ vào khả năng điều chỉnh áp suất thẩm thấu. Khả năng điều chỉnh áp suất thẩm thấu để duy trì cân bằng thế nước giữa tế bào với môi trường là hình thức thích nghi với hạn hán của nhiều cây. Khi đất khô hạn, áp suất thẩm thấu của dung dịch đất rất cao, cây muốn hút được nước vào phải điều chỉnh áp suất thẩm thấu theo hướng tăng lên cao hơn áp suất thẩm thấu của môi trường để có thể hút được nước. Sự điều chỉnh áp suất thẩm thấu bằng cách tích tụ các chất hoà tan trong tế bào làm tăng áp suất thẩm thấu của dịch bào. Để nâng cao tính chịu hạn của cây trước hết phải xác định khả năng chịu hạn của chúng, tùy mức độ chịu hạn mà có biện pháp tác động thích hợp. Các nhà khoa học cũng nhận thấy rằng sự khác nhau về khả năng duy trì áp suất thẩm thấu không ảnh hưởng nhiều đến năng suất trong điều kiện hạn cục bộ hay khi gieo trồng trong điều kiện tưới tiêu đầy đủ. Kết quả này có thể bắt nguồn từ nguyên nhân là do tập tính sinh trưởng, mức độ hạn và các đặc tính của các giống nghiên cứu. Khả năng duy trì áp suất thẩm thấu giữ vai trò quan trọng đó là khả năng duy trì áp suất thẩm thấu của bộ rễ do ảnh hưởng đến sức căng của rễ sẽ giúp cho việc đâm sâu vào các lớp đất vì vậy khả năng thu nhận nước sẽ được cải thiện hơn cho cây trong điều kiện hạn. Có nhiều phương pháp xác định tính chịu hạn của cây, có thể dựa vào những đặc điểm



gián tiếp đến khả năng chịu hạn của cây như hình thái giải phẫu, đặc điểm sinh lý đặc trưng của cây chịu hạn như: Cường độ thoát hơi nước, sức hút nước của tế bào, độ thiếu nước của cây, khả năng chịu héo của lá ... gặp điều kiện hạn hán mà cây vẫn sinh trưởng phát triển tốt, năng suất vẫn bình thường gần như khi không bị hạn thì cây đó có khả năng thích nghi với hạn cao, có thể chọn là giống cây chịu hạn [5], [11].

### **1.2.2. Tính chịu hạn và sự phát triển bộ rễ của cây đậu tương**

Cơ sở sinh lý, hóa sinh và sinh học phân tử của đặc tính chịu hạn của cây đậu tương được thể hiện ở (1) khả năng thích nghi của bộ rễ trong điều kiện hạn hán thể hiện ở sự phát triển và khả năng đâm xuyên của bộ rễ, khả năng cố định nitơ của cây đậu tương trong điều kiện hạn; (2) các tính trạng liên quan đến sự thích ứng của lá cây đậu tương trong điều kiện hạn như cường độ thoát hơi nước của khí khổng, cường độ thoát hơi nước của biểu bì, mật độ lông tơ của lá và hiệu quả sử dụng nước; (3) bản chất phân tử của mối liên quan giữa sự phát triển và khả năng đâm xuyên của rễ với khả năng chịu hạn của cây đậu tương [5], [7], [11].

Rễ là cơ quan chính cho sự hấp thụ nước và chất dinh dưỡng từ đất. Hệ thống rễ được quy định bởi các yếu tố môi trường bao gồm P, nitơ (N), Fe và nước. Dưới áp lực môi trường các phản ứng tương tác với nhau thông qua các con đường nội tại và con đường nội tại sẽ xác định mức độ đáp ứng. Đậu tương là một trong những cây trồng họ đậu được trồng rộng rãi nhất trên thế giới, tuy nhiên đậu tương bị hạn chế bởi điều kiện thổ nhưỡng khác nhau, đặc biệt là khả năng hấp thụ P trong đất. P là một trong những chất dinh dưỡng không có sẵn trong đất. Kiểu gen của đậu tương phản ứng với sự thiếu P thông qua sự thay đổi trong cấu trúc và hình thái của hệ thống rễ. Bằng cách sử dụng kỹ thuật lai trừ áp (SSH) gần đây đã có những nghiên cứu xác định



có 215 gen thiếu P do kiểu gen đậu tương gây ra. Ở cây đậu tương sự thích nghi với các điều kiện hạn hán chủ yếu thông qua việc phát triển rễ trụ để có thể tìm kiếm các nguồn nước từ các lớp đất sâu. Bên cạnh đó hệ thống rễ sợi cũng phát triển giúp cho cây hướng tới các lớp đất có độ ẩm cao và tìm kiếm các chất dinh dưỡng như phospho. Một trong những nhân tố chính ảnh hưởng đến độ sâu của rễ đậu tương là tỉ số kéo dài rễ trụ (taproot elongation rate). Do rễ trụ được hình thành đầu tiên ở đậu tương, chính vì thế việc xác định các giống đậu tương có đặc tính kéo dài rễ trụ nhanh sẽ cho phép xác định khả năng đâm sâu của rễ. Sự khác nhau về tính trạng kéo dài bộ rễ ở các giống đậu tương đã được nghiên cứu khá chi tiết ở trong điều kiện nhà lưới. Những nghiên cứu tiếp theo trên các giống có tỉ số kéo dài rễ trụ cao cho thấy những giống này có thể lấy nước ở chiều sâu trên 120 cm so với các giống còn lại. Một vài nghiên cứu cũng đã được thực hiện đối với hệ thống rễ nhánh của cây đậu tương cho thấy trong điều kiện hạn số lượng rễ nhánh trên đơn vị chiều dài rễ trụ tăng đáng kể, nhưng chiều dài và đường kính rễ trụ không thay đổi. Hạn chế về nước ở cây đậu tương thường làm tăng sinh khối của rễ, từ đó làm tăng tỉ lệ rễ/thân. Nghiên cứu cho thấy ở cây đậu tương được tưới nước có bộ rễ ngắn hơn so với cây đậu tương không được tưới nước, ngoài ra các nhà khoa học cũng nhận thấy mối tương quan rất chặt chẽ đối với nhiều tính trạng rễ như khối lượng khô, chiều dài, cấu trúc và số lượng rễ nhánh thường được dùng để đánh giá và nhận dạng các giống đậu tương có tính chịu hạn. Ở cây đậu tương, khi hạn hán xảy ra ở các giai đoạn sớm hay muộn của giai đoạn sinh trưởng sinh sản làm tăng mạnh sự phát triển bộ rễ, đặc biệt là hệ thống rễ ở các lớp đất sâu. Các kết quả từ các nghiên cứu được trình bày trên đây cho thấy những tính trạng liên quan đến bộ rễ có thể sử dụng để cải thiện tính chịu hạn của cây đậu tương bằng các phương pháp nhân giống thông thường.



Khả năng cố định nitơ ở các loài cây họ đậu thường rất nhạy cảm đối với tình trạng nước ở trong đất. Trong điều kiện hạn, cây đậu tương không chỉ giảm khả năng cố định CO<sub>2</sub>, giảm sự phát triển lá mà khả năng cố định nitơ cũng bị ảnh hưởng nghiêm trọng. Kết quả này làm giảm sinh tổng hợp protein vốn là thành phần quan trọng của hạt đậu tương và năng suất của cây trồng. Nhiều nhân tố hạn chế khả năng cố định nitơ trong điều kiện hạn đã được xác định ở cây đậu tương bao gồm khả năng sử dụng O<sub>2</sub> giảm, nguồn carbon tới các nốt sần giảm, hoạt tính của enzym sucrose synthase giảm, hàm lượng ure và acid amine tự do tăng. Tình trạng thiếu nước trong đất cũng dẫn tới sự tích lũy urê ở lá cây đậu tương và hậu quả này chính là nhân tố ức chế quá trình hình thành nốt sần [11].

### **1.3. CHUYỂN GEN VÀ CẢI THIỆN TÍNH CHỊU HẠN CỦA CÂY ĐẬU TƯƠNG**

#### **1.3.1. Gen liên quan đến tính chịu hạn của cây đậu tương**

Đặc tính chịu hạn ở cây đậu tương là tính trạng đa gen và các gen liên quan đến tính chịu hạn của đậu tương được chia làm hai nhóm: (i) các gen mà sản phẩm của chúng tham gia trực tiếp hình thành đặc tính chịu hạn của cây (ii) các gen mà sản phẩm tham gia điều hòa của nhóm gen chịu hạn.

Phản ứng của cây trồng đối với điều kiện khô hạn còn có sự tham gia của các gen thúc đẩy cây trồng nhận biết stress và truyền tín hiệu stress (stress signal). Các gen được kích hoạt trong thời kỳ khô hạn bao gồm các gen mã hóa protein kiểm soát quá trình truyền các tín hiệu stress và kiểm soát sự biểu hiện của gen. Cây trồng có sự phản ứng độc lập để ứng phó với điều kiện khô hạn, do nhiều gen khác nhau quy định, tạo ra mạng lưới các gen dày đặc và phức tạp, giúp cây chống lại với các stress từ ngoại cảnh, như nhiệt độ quá lạnh hoặc quá nóng, đất có độ mặn cao...[11].



Trong quá trình tăng trưởng tế bào thực vật tiết ra một loại protein gọi là expansin. Thực nghiệm của McQueen Mason cho thấy, tế bào ngừng tăng trưởng khi bị tách ra khỏi môi trường pH sinh trưởng, xử lý bởi nhiệt độ hoặc protease để loại bỏ hầu hết expansin [22]. Expansin là những protein ngoại bào làm nới lỏng thành tế bào thực vật và được coi là loại protein chủ yếu có ảnh hưởng đến việc kéo dài tế bào rễ ở thực vật. Các nhà khoa học có nhiều những thành công trong việc nghiên cứu vai trò của bộ rễ, cây có bộ rễ dài, khoẻ thì có khả năng lấy được nước ở dưới các lớp đất sâu. Expansin được mã hoá bởi multigene, mỗi gen thường được thể hiện những vị trí cụ thể ở mỗi loại tế bào. Mỗi Expansin ở mỗi vị trí xúc tác bởi endoglucanases. Ngoài các enzym và các tác nhân khác cũng làm tăng cường sự mở rộng thành tế bào, sự kéo dài tế bào gây ra bởi môi trường có tính axit và expansin với vai trò mở rộng thành tế bào đã tìm thấy ở nhiều đối tượng thực vật khác nhau như táo, rêu, dương xỉ, cây hạt trần. Expansin tác động đến thành tế bào thực vật giữ vai trò trong việc làm giãn dài tế bào, tăng kích thước tế bào đây cũng là chức năng sinh học của nó. Các protein thực vật được tạo thành từ 4 loại expansin  $\alpha$ , expansin  $\beta$ , expansin A(EXLA) expansin B(EXP B) [10]. Protein này liên kết chặt chẽ với các thành tế bào để mở thành tế bào và chống stress. Protein  $\beta$  như chất xúc tác của sự tăng trưởng axit, kích thích bởi độ pH ngoại bào. Tất cả expansin bao gồm hai miền, miền một xúc tác protein trong hydrolase-glycoside 45 (GH 45). Miền hai được thể hiện ở mức độ cao trong phần hoa. Bằng chứng thực nghiệm cho thấy rằng expansin nới lỏng thành tế bào bằng cơ chế nonenzymatic, expansin thường dài 250- 275 aa được tạo thành từ hai miền bởi tín hiệu peptide. Tất cả các protein  $\alpha$  expansin có độ pH tối ưu để mở rộng thành tế bào. Cả hai  $\alpha$  expansin và protein  $\beta$  expansin được kích hoạt bởi chất khử. Điều này cho thấy thành tế bào có sự oxi hoá khử được vận



chuyển bằng cách vận chuyển điện tử qua màng tế bào. Vai trò sinh học của expansin rất đa dạng như nói lỏng thành tế bào, làm mềm trái cây [15], [18].

Mức độ kéo dài tế bào thực vật được giới hạn bởi thành tế bào thực vật. Thành tế bào bao gồm polysaccharide, protein, hợp chất phenolic và các vật liệu khác, thành tế bào thực vật đóng vai trò quan trọng trong việc ra tăng kích thước và hình dạng của các tế bào thực vật. Để thay đổi thành tế bào trong tế bào thực vật bao gồm nhiều thành phần tế bào chẳng hạn như expansin, endoglucanases, endotransglycosylases xylolucan và gốc droxyl. Expansin được coi là thành phần chính cho sự kéo dài tế bào rễ. Các gen *GmEXP1* và *GmEXP2* là hai thành viên của expansin Multigene trong đậu tương. Phân tích hệ gen DNA trên gel blot để ước tính số lượng gen expansin trong bộ gen đậu tương. Gen *GmEXP2* là gen đơn bản sao.

### **1.3.2. Gen *GmEXP1* ở cây đậu tương**

Nhiều gen đã được phân lập từ hệ gen của một loạt các loài thực vật và kết quả thu được đã chỉ ra rằng chúng tạo thành một họ gen expansin. Expansin phân thành 3 họ  $\alpha$ ,  $\beta$ , và  $\gamma$  expansin [19]. Kết quả nghiên cứu của Kam và đồng tác giả (2005) cũng cho thấy hai gen *EXP1* và *EXPB2* liên quan đến sự tăng trưởng và phát triển của rễ cây. Lee et al (2003) [16] lần đầu tiên xác định được mối liên quan của gen expansin với sự kéo dài rễ cây đậu tương và cho biết mức độ biểu hiện rất cao. Kết quả này cho rằng gen EXP giữ một vai trò quan trọng trong quá trình phát triển của rễ, đặc biệt trong sự kéo dài rễ. *GmEXP*, *GmEXP2* và expansin khác trong họ expansin có độ tương đồng cao chỉ khác ở hàm lượng axit amin (aa). Nghiên cứu của Guo et al (2011) cho rằng gen beta expansin (*GmEXPB2*) ở đậu tương về bản chất có liên quan đến cấu trúc hệ thống rễ phù hợp phản ứng với stress phi sinh học từ môi trường. EXPB2 là protein tiết nằm trên thành tế bào, chủ yếu được biểu



hiện trong rễ và được đánh giá cao gây ra bởi môi trường thiếu P, đặc biệt khi P ở mức thấp. Ngoài ra EXPB2 cũng được tổng hợp trong điều kiện thiếu Fe và thiếu nước nhẹ. Còn ở *GmEXP1* chịu trách nhiệm kéo dài rễ. Mức độ biểu hiện của *GmEXP1* rất cao ở vùng gốc rễ và vùng kéo dài tế bào, không thấy có ở vùng rễ trưởng thành [15].

Cây đậu tương 5 ngày tuổi, rễ phát triển nhanh và tìm thấy mARN của gen EXP1 phong phú nhất ở rễ. Lai tại chỗ cho thấy *GmEXP1* có trong tế bào biểu bì, là lớp cơ bản trong rễ chính và phụ. Gen *GmEXP1* biểu hiện ở chỗ đẩy nhanh tốc độ tăng trưởng rễ, gen *GmEXP1* đóng vai trò quan trọng trong sự phát triển rễ đậu tương, đặc biệt là sự kéo dài của rễ chính và rễ phụ. Mức độ biểu hiện của gen *GmEXP1* rất mạnh trong khoảng thời gian hạt nảy mầm từ 1 ngày đến 5 ngày tuổi và giai đoạn kéo dài rễ diễn ra rất nhanh. Biểu hiện của gen *GmEXP1* làm tăng sự phát triển rễ của hạt cây thuốc lá chuyển gen và ít chịu tác động từ môi trường bên ngoài [10].

Rễ là cơ quan thực vật chuyên thực hiện quá trình hút nước và chất dinh dưỡng từ môi trường đất. Rễ là cơ quan tương đối đơn giản, được tạo thành từ lớp đồng tâm của các mô, gồm 3 loại cơ bản là các lớp biểu bì, vỏ và các mô mạch. Cắt dọc gốc rễ có thể được chia thành 3 khu vực khác nhau là tế bào phân chia, kéo dài và trưởng thành. Khu vực phân chia tế bào là gốc mô phân sinh đỉnh, chúng phân chia tế bào nhưng không kéo dài tế bào. Các tế bào có nguồn gốc từ khu vực phân chia tế bào thực hiện quá trình mở rộng gốc rễ. Sang đến giai đoạn kéo dài diễn ra ở khu vực kéo dài, sau khi các tế bào kéo dài và bắt đầu phân biệt trong các khu vực. Sự kéo dài xảy ra trong rễ và kiểm soát được sự mở rộng của tế bào và các áp lực của thành mạch bên trong tế bào. Sự phát triển của rễ khác với rễ chính trong nhiều khía cạnh trong khi đó rễ chính được hình thành như một rễ nhỏ tại các hypocotyl trong phôi, rễ thứ cấp được phát triển từ rễ chính nhưng không phải ở mô phân sinh



đỉnh. Mức độ kéo dài tế bào thực vật được giới hạn bởi thành tế bào. Thành tế bào bao gồm polysaccharides, protein, hợp chất phenolic và các chất khác, thành tế bào thực vật đóng vai trò trong sự hình thành kích thước và hình dạng của tế bào thực vật. Kích thước hay hình dạng tùy thuộc vào sự kéo dài hay sự trưởng thành của thành tế bào. Các thành phần có thể làm thay đổi thành tế bào thực vật như expansins, endoglucanases, endotransglycosylases, xyloglucan gốc hydroxyl. Gen *GmEXPI* được biểu hiện ở vùng kéo dài, đặc biệt là trong các tế bào biểu bì và nằm dưới lớp tế bào. Gen *GmEXPI* có 1089 bp với khung đọc mở mã hoá cho một polypeptit gồm 255 axit amin, trong đó có một trình tự tín hiệu giả định có 16 axit amin. Mức độ biểu hiện của gen *GmEXPI* liên quan đến tốc độ tăng trưởng của rễ. Biểu hiện của gen *GmEXPI* là kéo dài rễ nhanh chóng trong sự phát triển của bộ rễ cây đậu tương. Các gen *GmEXPI* được phát hiện hầu hết trong khu phân chia tế bào nằm ở lớp biểu bì và nằm dưới lớp tế bào trong khu vực kéo dài. Khi lai tại chỗ với mặt cắt ngang của các rễ chính để xác định sự biểu hiện của gen *GmEXPI* trong tế bào. Gen *GmEXPI* đóng vai trò quan trọng trong sự kéo dài rễ cây đậu tương đặc biệt ở trong quá trình kéo dài rễ chính và rễ thứ cấp. Khi có kết quả nghiên cứu về gen *GmEXPI* đã cho thấy rằng sự biểu hiện của gen *GmEXPI* xảy ra ở vị trí và trong thời gian xác định của quá trình phát triển rễ cây đậu tương [16], [19].

### 1.3.3. Chuyển gen gián tiếp thông qua *A. tumefaciens*

*Agrobacterium* là một nhóm vi sinh vật gram âm, gây ra các triệu chứng bệnh ở cây khi xâm nhiễm qua vết thương. Chi *Agrobacterium* bao gồm một số nhóm chính là *A. tumefaciens* gây bệnh u thân cây, *A. rhizogens* gây bệnh rễ tóc và *Agrobacterium rubi* gây bệnh u cho các cây dâu đất, mâm xôi, [13]...



Trong các loài trên thì *A. tumefaciens* thường được sử dụng trong chuyển gen do nhiều đặc tính ưu việt của hệ thống chuyển gen này. Những ưu điểm của chuyển gen thông qua hệ thống *Agrobacterium* với súng bắn gen bao gồm khả năng chuyển đoạn tương đối lớn của DNA, tạo ra ít hơn các bản sao gen chuyển được tích hợp vào bộ gen thực vật, ít có sự sắp xếp lại gen chuyển, sự sắp xếp rải rác DNA của hệ gen với tần số thấp hơn và giảm biểu hiện bất thường ở gen chuyển [14]. Hơn nữa, hệ thống này bao gồm chi phí vận hành thấp và cách thức chuyển đổi đơn giản. Tuy nhiên, thực vật rất khác nhau trong tính miễn cảm với *Agrobacterium* xảy ra giữa các loài, giống cây trồng hoặc mô. Do vậy, hệ thống chuyển gen này thường thu được kết quả với tỷ lệ chuyển gen thấp hơn so với súng bắn gen [27].

*A. tumefaciens* chủ yếu lây nhiễm thực vật qua các vết thương hình thành nên các khối u ở thân cây và thường gặp ở chỗ tiếp giáp giữa rễ và thân. Từ các khối u của cây cho thấy sự hình thành một số chất mới như nopaline và octopine được gọi chung là opine, các chất opine này không tồn tại ở những cây bình thường. Bên cạnh đó, các khối u không ngừng tăng trưởng kể cả khi đã tiêu diệt hết các vi khuẩn trong cây đã bị nhiễm là do *A. tumefaciens* có chứa các plasmid có kích thước lớn và có khả năng tự sao chép độc lập. Những vi khuẩn có plasmid mang gen gây khối u cho cây này được gọi là Ti plasmid (Tumor inducing plasmid). Ti plasmid có kích thước khoảng 200 kb, trong tế bào chúng tồn tại như một đơn vị sao chép độc lập gồm 4 vùng tương đồng: A, B, C và D. Ti plasmid không được dùng trực tiếp trong các thí nghiệm chuyển gen do một số nhược điểm: Kích thước lớn, mang các gen gây khối u, không thể tự nhân lên... Vì vậy, các nhà khoa học đã cải tiến Ti plasmid, cắt bỏ hầu hết các gen không cần thiết và thay vào đó là các gen chỉ thị cho chọn lọc, gen đánh dấu và các promoter thích hợp để Ti plasmid có thể nhân lên và biểu hiện trong vi khuẩn *E. coli*, *A. tumefaciens* và tế bào thực vật.



Khi lây nhiễm vào tế bào thực vật, một phần nhỏ của Ti plasmid khoảng 25kb được gọi là T-DNA được chuyển và gắn vào hệ gen của thực vật. Nhờ vậy đoạn T-DNA tồn tại trong hệ gen của thực vật mà nó gắn vào. Trong Ti plasmid đoạn T-DNA được giới hạn bằng bờ phải (R) và bờ trái (L) có các đoạn nucleotit tương tự nhau. Đoạn T-DNA chứa các gen tổng hợp auxin, cytokinin, đó là các gen gây khối u và chứa các gen tổng hợp ra opine.

Ngoài đoạn T-DNA, trên Ti plasmid còn chứa các gen E, D, C, G, B, A tạo ra các enzym tương ứng – các enzym này có chức năng cắt đứt bờ phải và bờ trái để giải phóng T-DNA, chịu trách nhiệm lây nhiễm như có chức năng bọc T-DNA, vận chuyển và gắn T-DNA vào tế bào vật chủ. Ti plasmid còn có điểm khởi đầu sao chép Ori và các gen đồng hóa opine [2].

Hệ thống chuyển gen gián tiếp thông qua *A. tumefaciens* ở cây đậu tương đã được Hinchey và cs (1988) sử dụng nạch lá mầm làm mô đích. Sau đó, những tiến bộ trong kỹ thuật chuyển gen và tái sinh cây đậu tương chuyển gen liên tiếp đạt được thành công. Nhiều nghiên cứu đã sử dụng các mô đích khác nhau để chuyển gen như: phôi mầm đang phát triển [24], qua mô sẹo [17]...

#### **1.3.4. Một số kết quả nghiên cứu chuyển gen ở cây đậu tương**

Nghiên cứu khả năng tiếp nhận gen của đậu tương bằng cách gây tổn thương vào nạch lá mầm được Hinchey và cs nghiên cứu lần đầu tiên năm 1998. Sau đó nhiều nhóm tác giả ở các phòng thí nghiệm khác nhau trên thế giới tiến hành ứng dụng, nghiên cứu cải tiến phương pháp nhằm nâng cao hiệu quả biến nạp [21], [23].

Trong những năm gần đây đã có một số tác giả quan tâm nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật chuyển gen ở cây đậu tương và tập trung vào hướng cải thiện, nâng cao khả năng chịu hạn, kháng sâu của cây đậu tương. Trần Thị



Cúc Hòa (2007), đã tiến hành nghiên cứu khả năng đáp ứng chuyển nạp gen của các giống đậu tương trồng ở Việt Nam và đã thu được một số dòng đậu tương biến đổi gen có sự thay đổi về năng suất, kháng sâu [3]. Nguyễn Thị Thúy Hương (2011) chuyển gen *P5CSm* vào giống đậu tương DT84 với 1262 mẫu biến nạp thu được 3 dòng cây dương tính với PCR, hiệu suất là 0,24% [5]; Nguyễn Thu Hiền (2011) biến nạp cấu trúc chứa đoạn gen *HA1* của virus H5N1 vào 650 mẫu lá mầm của giống đậu tương DT12 thu được 8 dòng cây dương tính với PCR tương ứng với hiệu suất chuyển gen là 1,23% [4]. Với hệ thống vector pCambia3301, Trần Cúc Hòa (2007) đã sử dụng biến nạp cho 42 giống đậu tương khác nhau thông qua nách lá mầm và thu được kết quả khá cao ở tỷ lệ biểu hiện tạm thời của gen *GUS* (trung bình 60,4%). Kết quả phân tích Southern blot cho thấy hiệu quả chuyển gen đạt 2-5% [26]. Việc tạo cây chuyển gen chịu hạn đã mở ra một triển vọng mới trong tạo thực phẩm sạch và an toàn cho môi trường.



## Chương 2

# VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

## 2.1. VẬT LIỆU, HÓA CHẤT, THIẾT BỊ VÀ ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU

### 2.1.1. Vật liệu

Giống đậu tương DT84 do Trung tâm Nghiên cứu và phát triển Đậu đỗ, Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm- Viện khoa học Nông nghiệp Việt Nam cung cấp. Đây là giống quốc gia trồng phổ biến ở miền Bắc Việt Nam.

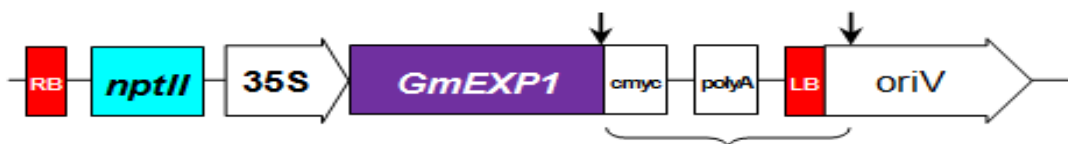


**Hình 2.1. Hình ảnh hạt giống đậu tương DT84**

Chúng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* chứa vector tái tổ hợp pCB301-*GmEXPI* mang gen chuyển *GmEXPI* do Đề tài cấp Đại học Thái Nguyên, mã số DH2012-TN01-04 cung cấp.

Cấu trúc pCB301-*GmEXPI* gồm promoter 35S, gen *GmEXPI*, đuôi cmcy và polyA (Hình 2.2). *GmEXPI* liên quan đến sự kéo dài rễ được phân lập từ giống đậu tương SL1, giống có bộ rễ phát triển rễ mạnh [9], [20].





**Hình 2.2. Sơ đồ cấu trúc vector pCB301-*GmEXP1* mang gen chuyển *GmEXP1* [9]**

*CaMV35S* là promoter mạnh phân lập từ virus gây khảm súp lơ;

*GmEXP1*- Gen expansin phân lập từ giống đậu tương chịu hạn SL1

*cmv* – chuỗi peptide kháng nguyên để xác định sản phẩm protein đích khi dùng kháng thể tương ứng bằng Western blot

### 2.1.2. Hoá chất và thiết bị

Các loại hóa chất sử dụng trong các thí nghiệm được cung cấp bởi các Hãng Fermentas, Invitrogen, Merck, Sigma, Amersham Pharmacia Biotech, như: Yeast extract, NaCl, agarose, sucrose, glucose, trypton, KCl, tris HCl, EDTA, NaOH, MgSO<sub>4</sub>, MgCl<sub>2</sub>, glycerol, CaCl<sub>2</sub>, ethanol. Các loại kháng sinh kanamycin, rifamicine, cefotaxime và các hóa chất thông dụng khác (X-gal, agarose,...) ...

Các thiết bị dùng trong nuôi cấy mô tế bào thực vật: box cấy vô trùng, bình nuôi cấy, nồi khử trùng, bể ổn nhiệt, máy nuôi lắc, máy đo pH, máy quang phổ,... Một số thiết bị dùng trong sinh học phân tử: Máy PCR System 9700 (Applied Biosystem, Mỹ), máy điện di Powerpac300 (Bio-Rad, Mỹ), máy chụp ảnh, máy soi gel, máy ly tâm, máy xung điện Gen Plulser cùng với các trang thiết bị khác.

### 2.1.3. Địa điểm nghiên cứu

Các thí nghiệm chuyển gen ở đậu tương thông qua *A. tumefaciens* được tiến hành trên trang thiết bị của Phòng thí nghiệm Công nghệ tế bào, Khoa



Sinh - Kỹ thuật nông nghiệp, Trường Đại học Sư phạm – Đại học Thái Nguyên từ tháng 7/2014 đến 2/2015.

Thí nghiệm PCR xác định sự có mặt của gen chuyển được thực hiện tại Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

## **2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU**

Luận văn sử dụng các nhóm phương pháp nghiên cứu, như: (1) chuyển gen gián tiếp nhờ lây nhiễm *A. tumefaciens* qua rách lá mầm hạt chín; (2) tái sinh cây đậu tương *in vitro*; (3) phân tích cây chuyển gen; (4) phương pháp xác định hiệu suất chuyển gen.

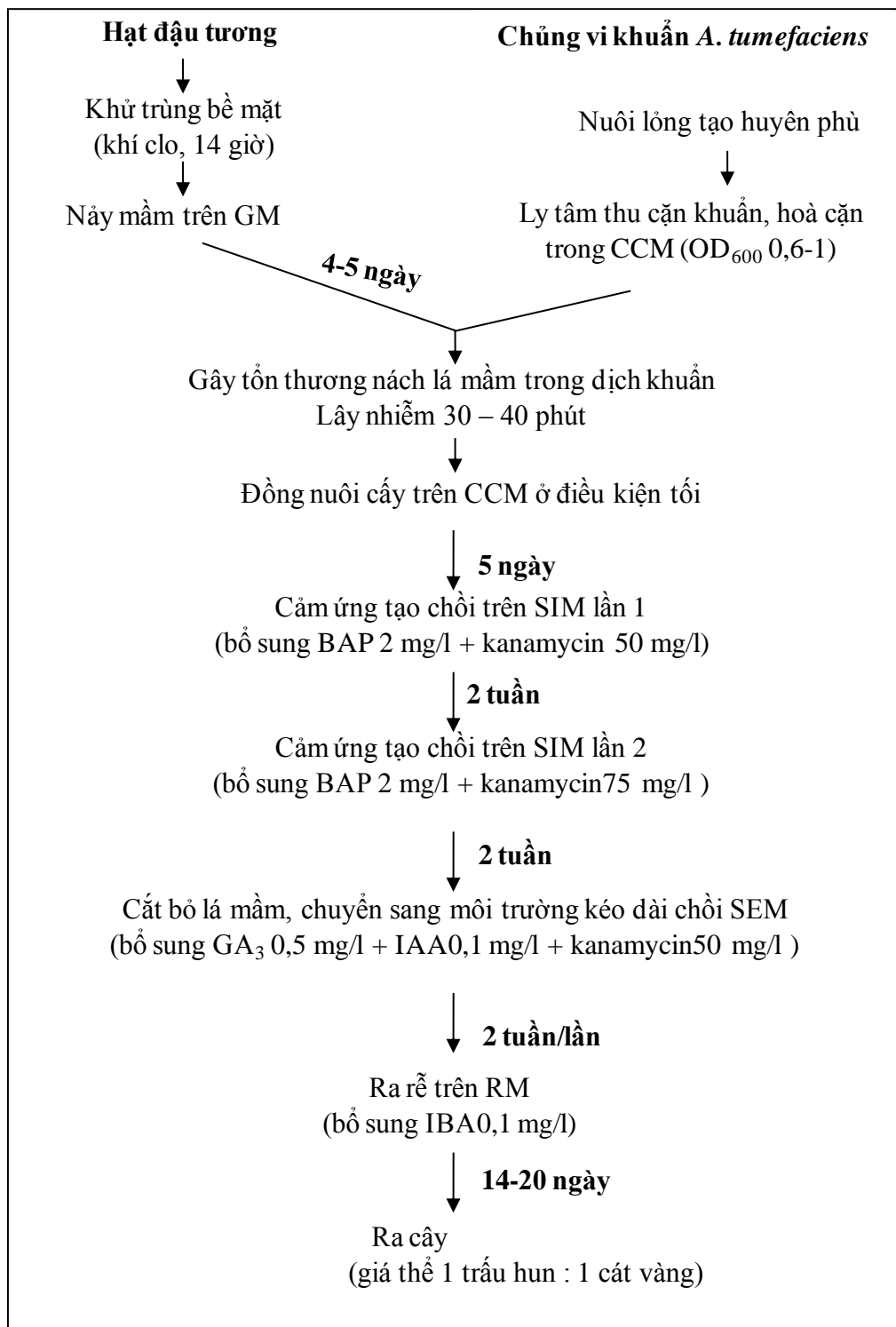
### **2.2.1. Phương pháp chuyển gen gián tiếp nhờ lây nhiễm *A. tumefaciens* qua rách lá mầm hạt chín**

Phương pháp chuyển gen gián tiếp thông qua rách lá mầm hạt chín được tiến hành dựa trên nghiên cứu của Olhoft và cs (2001) [23]; Nguyễn Thu Hiền (2011) [4]; Các thí nghiệm được tiến hành theo các bước như mô tả tại sơ đồ hình 2.3.

Hạt đậu tương chín, loại bỏ hạt kém chất lượng, sau đó tiến hành khử trùng bằng khí clo trong khoảng thời gian 14 giờ. Cây hạt đậu tương đã khử trùng trong môi trường GM sau 5 -7 ngày, tách và thu phần lá mầm được, gây tổn thương bằng mũi dao nhọn từ 7-8 lần vào phần rách lá mầm. Lá mầm đã bị tổn thương được nhiễm khuẩn *Agrobacterium* tái tổ hợp.

Mẫu được ngâm trong dịch huyền phù vi khuẩn có OD<sub>600</sub> đạt 0,6-1 trong thời gian 30 phút. Sau thời gian nhiễm khuẩn, mẫu được chuyển sang môi trường đồng nuôi cấy CCM đặc. Quá trình đồng nuôi cấy diễn ra trong tối, ở 25<sup>0</sup>C trong thời gian là 5 ngày.





**Hình 2.3. Các bước thí nghiệm chuyển gen gián tiếp qua rách lá mầm ở đậu tương**



Sau thời gian đồng nuôi cấy, mẫu biến nạp được lắc trong môi trường cảm ứng tạo chồi (SIM) có bổ sung 500 mg/l cefotaxim với thời gian là 10 phút, sau đó thấm khô bằng giấy thấm khử trùng. Cắt bỏ chồi chính trên các mảnh lá mầm và cấy mẫu lên môi trường tạo cụm chồi có bổ sung 500 mg/l cefotaxim. Theo dõi tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi, số chồi trung bình /cụm sau thời gian cảm ứng là 2 tuần để đánh giá khả năng tạo đa chồi của giống đậu tương cũng như mức độ phù hợp của môi trường.

Sau thời gian 2 tuần, mẫu được chuyển sang môi trường SIM đặc có bổ sung 500 mg/l cefotaxim và kháng sinh thích hợp.

Sau 2 tuần, các cụm chồi sống được trên môi trường chọn lọc sẽ được chuyển sang môi trường phát triển chồi (SEM) có bổ sung 500 mg/l cefotaxim và kháng sinh thích hợp. Khi các chồi phát triển đạt kích thước từ 3-5 cm sẽ được chuyển sang môi trường ra rễ (RM) có bổ sung 250 mg/l cefotaxim để tạo cây hoàn chỉnh.

Ra cây trên giá thể và trồng trong điều kiện tự nhiên.

Các thí nghiệm được thực hiện trong phòng nuôi cây với điều kiện chiếu sáng theo quang chu kỳ 16 giờ sáng và 8 giờ tối, nhiệt độ phòng  $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ , cường độ chiếu sáng 200 lux.

### **2.2.2. Phương pháp tái sinh *in vitro***

Kỹ thuật tái sinh cây đậu tương đa chồi từ nách lá mầm hạt chín được tiến hành dựa trên phương pháp của Olhoft và cs (2001) [23]; Nguyễn Thị Thúy Hương (2009) [6] và Nguyễn Thu Hiền (2011) [4]. Thành phần các loại môi trường sử dụng để tái sinh cây qua đa chồi từ nách lá mầm hạt chín được chỉ ra trong bảng 2.1



**Bảng 2.1. Thành phần các loại môi trường tái sinh *in vitro***

<b>Loại môi trường</b>	<b>Kí hiệu</b>	<b>Thành phần</b>
Nảy mầm hạt (Germination medium)	GM	Muối B5 (3,052 g/l) + sucrose (20 g/l) + agar (6 g/l), pH = 5,8 Bổ sung: vitamin B5(1 mg/l)
Đồng nuôi cấy (Co-cultivation medium)	CCM	Muối B5 (0,316 g/l) + MES (3,9 g/l) + sucrose (30 g/l) + agar (5 g/l), pH = 5,4 Bổ sung: vitamin B5 (1 mg/l) + AS (0,2 mM) + L-cysteine (400 mg/l) + Sodium thiosulfate(158 mg/l) + DTT (154 mg/l) + GA <sub>3</sub> (0,25 mg/l) + BAP
Cảm ứng tạo đa chồi (Shoot induction medium)	SIM	Muối B5(3,052 g/l) + MES (0,59 g/l) + sucrose (30 g/l), pH = 5,6 Bổ sung: vitamin B5 (1 mg/l) + BAP(2 mg/l) + kháng sinh
Kéo dài chồi (Shoot elongation medium)	SEM	MS (4,3 g/l) + MES( 0,59 g/l) + sucrose (30 g/l) + agar (6 g/l), pH = 5,6 Bổ sung: vitamin B5 1 mg/l + L-asparagine (50 mg/l) + L-pyroglutamic acid (100 mg/l) + IAA(0,1 mg/l) + GA <sub>3</sub> (0,5 mg/l)
Ra rễ (Rooting medium)	RM	MS (1,58 g/l) + MES (0,59 g/l) + sucrose (20 g/l) + agar (6 g/l), pH = 5,6 Bổ sung: IBA(0,1 mg/l) + vitamin B5 (1 mg/l)



Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp lại. Thí nghiệm được thực hiện trong phòng nuôi cây với điều kiện chiếu sáng theo quang chu kỳ 16 giờ sáng và 8 giờ tối, nhiệt độ phòng  $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ , cường độ chiếu sáng 200 lux.

Hạt chín lựa chọn hạt chất lượng, tiến hành khử trùng bằng khí clo trong bình kín có tủ hút. Sau khi khử trùng, cho hạt nảy mầm trên môi trường GM, sau 4-5 ngày cắt lấy phần lá mầm, tách đôi hai lá mầm, loại đỉnh sinh trưởng. Phần lá mầm còn lại được đặt lên môi trường cảm ứng tạo đa chồi (SIM). Theo dõi tỷ lệ mẫu tạo cụm chồi, số chồi trung bình /cụm sau thời gian cảm ứng là 4 tuần để đánh giá khả năng tạo đa chồi của giống đậu tương cũng như mức độ phù hợp của môi trường.

Các cụm chồi được tạo ra từ quá trình nuôi cấy trên môi trường SIM được chuyển sang môi trường kéo dài chồi SEM. Đánh giá khả năng kéo dài của chồi sau 2 tuần dựa trên việc theo dõi và thống kê số chồi kéo dài/cụm nuôi cấy cũng như chất lượng chồi.

Khi các chồi đạt chiều cao từ 4-5 cm, chọn những chồi khỏe chuyển sang môi trường ra rễ RM. Khi cây *in vitro* có 3 lá, có bộ rễ đảm bảo (thường sau 2 tuần nuôi cấy) sẽ thực hiện việc ra cây. Cây được lấy ra khỏi bình nuôi cấy một cách nhẹ nhàng, rửa sạch phần agar bám quanh gốc và rễ, sau đó cây được đặt trên giá thể ra cây. Cây sống sót trên giá thể được đưa ra trồng trên chậu đất có bổ sung phân bón và trồng trong điều kiện nhà lưới.

### **2.2.3. Phương pháp phân tích cây chuyển gen**

DNA tổng số từ các mẫu lá non được tách chiết theo phương pháp của Saghai Maroof và cs (1984) [25] với thành phần đệm chiết ở bảng 2.2.



**Bảng 2.2.** Thành phần đệm tách DNA tổng số

STT	Nồng độ gốc	Nồng độ sử dụng
1	Tris-HCl 1M, pH 8	100 mM
2	NaCl 5M	1,4M
3	EDTA 0,5M, PH 8	50 mM
4	CTAB	2% (w/v)
5	Nước khử ion vô trùng	

Các bước tiến hành:

- (1) Nghiền mẫu lá trong nitơ lỏng bằng cối chày sứ. Bột đã nghiền cho vào ống Eppendorf 1,5 ml. Thêm 700µl đệm tách, đảo đều và ủ ở 65°C trong 90 phút.
- (2) Bổ sung 700µl hỗn hợp Chloroform : Isoamyl alcohol (tỷ lệ 24:1) vào mỗi ống, đảo đều sau đó ly tâm ở 13000 vòng/phút trong 15 phút.
- (3) Hút 500 µl dịch nổi pha trên sang ống eppendorf khác, bổ sung 500 µl isopropanol lạnh. Để mẫu trong tủ -20°C trong 30 phút.
- (4) Ly tâm thu 13000 vòng/phút ở 4°C trong 15 phút để thu tua DNA, sau đó rửa tua bằng cồn 70°C.
- (5) Loại bỏ cồn, làm khô tua ở điều kiện nhiệt độ phòng và hòa tan DNA trong nước khử ion vô trùng và bảo quản ở -20°C.

Phản ứng PCR nhân đoạn gen *GmEXPI* từ DNA tổng số của các dòng cây được tiến hành với các cặp mồi đặc hiệu (bảng 2.3).



**Bảng 2.3.** Trình tự các cặp mồi được sử dụng trong nghiên cứu

Ký hiệu	Trình tự nucleotide (5' - 3')	Sản phẩm (bp)
SoyEXPIFncoI	CATGC CATGGATGGGCAAAATCATGCTTGT	790 (DNA)
SoyEXPIRnotI	ATTTGC GGCCGCTTAGAACTGAACTGGGCTAGA	1513 (DNA)

Thành phần phản ứng và chu kỳ nhiệt của phản ứng PCR (Bảng 2.4 và Bảng 2.5)

**Bảng 2.4.** Thành phần của phản ứng PCR

STT	Thành phần	Nồng độ
1	Nước khử ion	13µl
2	Đệm PCR 10X	2.5µl
3	MgCl <sub>2</sub> (25mM)	2µl
4	dNTPs (10mM)	2.5µl
5	Mồi xuôi (10pmol/µl)	1µl
6	Mồi ngược (10pmol/µl)	1µl
7	Taq DNA polymerase ( 5 đơn vị/ µl)	1µl
8	DNA khuôn ( 10 – 20 ng/µl)	2µl
<i>Tổng</i>		25µl



**Bảng 2.5. Chu kỳ nhiệt cho phản ứng PCR**

Bước	Phản ứng	Nhiệt độ (°C)	Thời gian	Chu kỳ
1	Biến tính	94	3 phút	1
2	Biến tính	94	1 phút	30
3	Gắn mồi	56	1 phút	
4	Kéo dài chuỗi	72	1 phút	
5	Hoàn tất kéo dài	72	10 phút	1
6	Kết thúc phản ứng	4	∞	

Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8% và chụp ảnh.

#### **2.2.4. Phương pháp xác định hiệu suất cây chuyển gen**

Hiệu suất chuyển gen được tính theo công thức:

$$\text{Hiệu suất chuyển gen} = \frac{\text{Số dòng cây chuyển gen dương tính với PCR}}{\text{Tổng số mẫu biến nạp}} (\%)$$

Mỗi mẫu biến nạp là mảnh lá mầm được tái sinh chồi từ nách lá mầm và qua hai lần chọn lọc bằng kháng sinh. Các chồi sống sót sau chọn lọc được chuyển sang môi trường ra rễ và đưa ra trồng trên giá thể. Số cây sống trên giá thể của mỗi mẫu biến nạp dương tính với PCR lập thành một dòng cây chuyển gen.



## Chương 3

### KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. KẾT QUẢ CHUYỂN CẤU TRÚC pCB301-*GmEXPI* VÀO CÂY ĐẬU TƯƠNG VÀ TÁI SINH IN VITRO

Chúng tôi tiến hành thí nghiệm chuyển cấu trúc pCB301-*GmEXPI* vào giống đậu tương DT84 qua nách lá mầm hạt chín bằng phương pháp chuyển gen gián tiếp qua *A. tumefaciens*, dựa trên phương pháp của Olhoft và cs (2001) và Nguyễn Thu Hiền và cs (2011) [4], [23].

Hạt đậu tương chín của giống DT84 được chọn (hình 3.1A) và loại bỏ hạt kém chất lượng đem khử trùng bằng khí clo trong nồi thủy tinh đáy nắp kín được đặt trong tủ hút. Thời gian tiến hành khử trùng là 14 giờ (hình 3.1B).



**A**



**B**

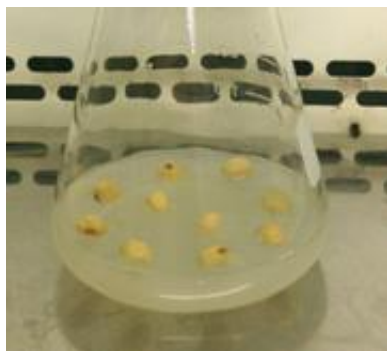
**Hình 3.1. Giai đoạn chuẩn bị để cấy hạt trên môi trường GM**

(A: Lựa chọn hạt; B: Khử trùng hạt bằng khí clo)

Hạt sau khi khử trùng được cấy trên môi trường GM (hình 3.2A) trong phòng nuôi cây với điều kiện chiếu sáng theo quang chu kỳ 16 giờ sáng và 8 giờ tối, nhiệt độ phòng  $25^{\circ}\text{C} \pm 2$ , cường độ chiếu sáng 200 lux. Sau từ 5- 7



ngày, kích thước mầm đạt khoảng 5cm và lá mầm xanh (hình 3.2B), các mảnh lá mầm được thu để phục vụ biến nạp.



**A**



**B**

**Hình 3.2. Hạt nảy mầm trên môi trường GM**

*(A: Hạt đậu tương mới cấy trên môi trường GM; B: Hạt đậu tương 6 ngày tuổi)*

Toàn bộ quá trình biến nạp được thao tác trong box khử trùng. Chúng tôi tiến hành cắt lấy lá mầm, tách hai lá mầm, loại bỏ chồi chính, dùng mũi dao nhọn gây tổn thương vào nách lá mầm từ 5- 7 lần. Lá mầm đã gây tổn thương được ngâm trong ngâm trong dịch huyền phù chứa vi khuẩn mang cấu trúc pCB301-*GmEXPI* có OD<sub>600</sub> đạt 0,6-1 trong thời gian 30 phút (hình 3.3B). Sau thời gian nhiễm khuẩn, mẫu được chuyển sang môi trường đồng nuôi cấy CCM đặc. Quá trình đồng nuôi cấy diễn ra trong tối, ở 25<sup>0</sup>C trong thời gian là 5 ngày.





**Hình 3.3. Mảnh lá mầm và biến nạp cấu trúc chứa gen chuyển qua nách lá mầm**

*A- Mảnh lá mầm, B- Mảnh lá mầm ngâm trong dung dịch huyền phù chứa vi khuẩn mang cấu trúc pCB301-GmEXP1*

Sau thời gian đồng nuôi cấy, mẫu biến nạp được lắc trong môi trường cảm ứng tạo chồi (SIM) có bổ sung 500 mg/l cefotaxim với thời gian là 10 phút, sau đó thấm khô bằng giấy thấm khử trùng. Cắt bỏ chồi chính trên các mảnh lá mầm và cấy mẫu lên môi trường tạo cụm chồi có bổ sung 500 mg/l cefotaxim. Sau thời gian 2 tuần, mẫu được chuyển sang môi trường SIM đặc có bổ sung 500 mg/l cefotaxim và kháng sinh thích hợp.

Sau 2 tuần, các cụm chồi sống được trên môi trường chọn lọc sẽ được chuyển sang môi trường phát triển chồi (SEM) có bổ sung 500 mg/l cefotaxim và kháng sinh thích hợp (Hình 3.4).





**A**



**B**



**C**



**D**

**Hình 3.4. Hình ảnh đa chồi và kéo dài chồi ở đậu tương DT84**

*A, B: Cảm ứng tạo đa chồi trên SIM bổ sung BAP 2mg/l và kanamycin;*

*C, D: Chuyển sang môi trường kéo dài chồi SEM trong 2 tuần (bổ sung GA<sub>3</sub> 0,5 mg/l + IAA 0,1 mg/l + kanamycin 50 mg/l);*

Khi các chồi phát triển đạt kích thước từ 3-5cm sẽ được chuyển sang môi trường ra rễ (RM) có bổ sung 250 mg/l cefotaxim để tạo cây hoàn chỉnh (Hình 3.5).



**A**



**B**



**C**

**Hình 3.5. Kết quả tái sinh và biến nạp ở đậu tương DT84**

*A, B: Ra rễ trên môi trường RM (bổ sung IBA 0,1 mg/l) trong 20 ngày; C: Ra cây*



Thí nghiệm được lặp lại 3 lần và cùng với các lô thí nghiệm là 2 lô đối chứng: ĐC0- lá mầm đậu tương không chuyển gen được cấy trên môi trường tái sinh có bổ sung kháng sinh và ĐC1- lá mầm đậu tương không chuyển gen được cấy trên môi trường tái sinh không bổ sung kháng sinh. Kết quả được trình bày ở bảng 3.1.

**Bảng 3.1.** Kết quả biến nạp cấu trúc pCB301-*GmEXP1* nhờ *A.tumefaciens* qua nách lá mầm

Lô thí nghiệm	Số mẫu biến nạp	Số mẫu tạo đa chồi	Số chồi kéo dài	Số chồi ra rễ	Số cây trồng trên giá thể
ĐC1	100	45	30	22	12
ĐC0	100	0	0	0	0
1	150	47	21	11	1
2	170	52	27	9	1
3	210	75	33	12	2
<b>Tổng (1, 2, 3)</b>	<b>530</b>	<b>174</b>	<b>81</b>	<b>32</b>	<b>4</b>

Kết quả thống kê ở bảng 3.1 cho thấy, với biến nạp 530 mẫu, thu được 174 mẫu tạo chồi và có 81 chồi kéo dài trên môi trường chọn lọc SEM chứa 50 mg/l kanamycin, trong đó 32 chồi ra rễ, và thu được 4 cây đậu tương chuyển gen được trồng trên giá thể trong nhà lưới. Trong khi đó ở lô đối chứng ĐC0- không chuyển gen được nuôi cấy trên môi trường chọn lọc bằng kháng sinh, với 100 mẫu thí nghiệm không xuất hiện mẫu nào tạo chồi trong môi trường chọn lọc kháng sinh và kết quả không thu được cây ra rễ và trồng trên giá thể. Trong 100 mẫu ở lô đối chứng ĐC1 có 45 mẫu tạo chồi, 30 chồi được kéo dài và 22 chồi ra rễ và 12 cây được trồng trên giá thể.



Trong thí nghiệm này, chúng tôi chọn phương pháp chuyển gen gián tiếp. Ở phương pháp chuyển gen trực tiếp, gen được chuyển trực tiếp vào tế bào thực vật thông qua những thiết bị hoặc thao tác nhất định mà không cần nhờ những sinh vật trung gian. Tuy nhiên, tất cả các phương pháp chuyển gen trực tiếp đòi hỏi kỹ thuật cao, chính xác và rất tốn kém mà khả năng tái sinh sau chuyển gen lại thấp, do vậy trong thí nghiệm này chúng tôi sử dụng phương pháp chuyển gen gián tiếp thông qua vi khuẩn *A.tumefaciens*, vì phương pháp này mang lại hiệu quả cao và kinh tế hơn [2].

Trong nghiên cứu chuyển gen gián tiếp ở thực vật, chủng vi khuẩn được sử dụng phổ biến nhất là *A. tumefaciens* và *A. rhizogens* do hai loài này có khả năng xâm nhiễm qua vết thương của hầu hết các loài thực vật hai lá mầm và một số ít các loài thực vật một lá mầm. Kết quả là gây ra những khối u hay hình thành lông rễ theo cơ chế tự nhiên. Trong đó vi khuẩn *A. tumefaciens* được sử dụng rộng rãi hơn cả. Phương pháp chuyển gen gián tiếp nhờ *A. tumefaciens*, ít tốn kém nhưng vẫn mang lại hiệu quả, thuận lợi cho việc phân tích cây chuyển gen và không gây tổn thương tế bào [2].

### 3.2. KẾT QUẢ PHÂN TÍCH CÂY ĐẬU TƯƠNG CHUYỂN GEN Ở THỂ HỆ T<sub>0</sub>

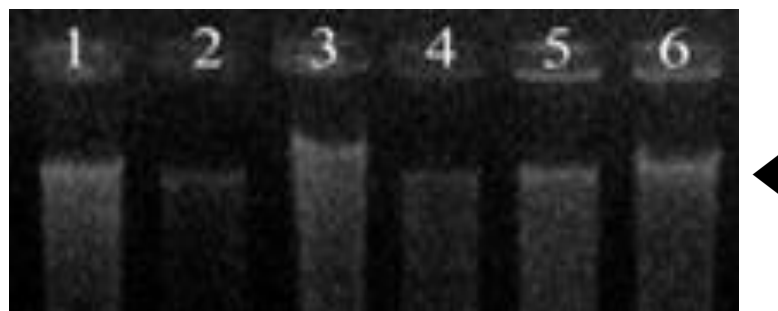
Trong 530 mẫu biến nạp đã thu được 4 cây chuyển gen trồng trên giá thể, trong đó có 3 cây sống sót (Bảng 3.2).

**Bảng 3.2.** Kết quả tái sinh và số cây chuyển gen sống sót ở thể hệ T<sub>0</sub>

Số mẫu biến nạp	Số cây chuyển gen trồng trên giá thể	Số cây chuyển gen sống sót
530	4	3



Từ 6 mẫu lá của 3 cây đậu tương chuyển gen sống sót trên giá thể trồng trong nhà lưới được sử dụng để tách chiết DNA tổng số theo phương pháp Saghai Maroof và cs (1984) [25]. Kết quả tách chiết DNA tổng số từ các mẫu lá đậu tương chuyển gen được điện di trên gel agarose 0,8% (Hình 3.6).



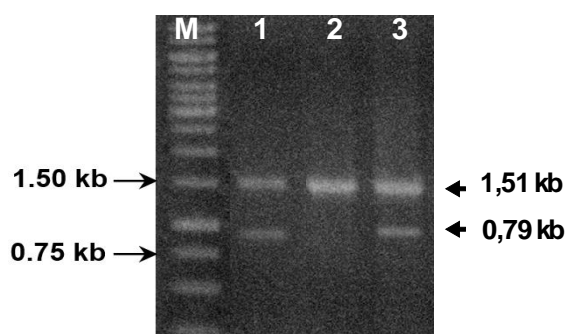
**Hình 3.6. Kết quả điện di DNA tổng số tách từ các mẫu lá đậu tương chuyển gen**

(1, 2- mẫu DNA tách từ lá của cây số 1; 3, 4- mẫu DNA tách từ lá của cây số 2; 5, 6- mẫu DNA tách từ lá của cây số 3)

Hình 3.6 cho thấy DNA tổng số tách từ mẫu số 2, 4 có hàm lượng ít, còn các mẫu 1, 3, 5, 6 có hàm lượng nhiều hơn, nhưng có thể có nhiều đứt gãy. Nhìn chung các mẫu DNA tổng số đều đảm bảo hàm lượng và chất lượng cho phản ứng PCR.

Xác định sự có mặt của gen chuyển *GmEXPI* trong 3 dòng cây đậu tương chuyển gen ở thế hệ  $T_0$  được tiến hành bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu *SoyExpIF\_NcoI*/ *SoyExp1R\_NotI* từ DNA tách từ lá các cây đậu tương chuyển gen, kết quả được thể hiện ở hình 3.7.





**Hình 3.7. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR nhân gen *GmEXPI* từ ba dòng cây đậu tương chuyển gen ở thế hệ  $T_0$**

Hình 3.7 cho thấy cả ba dòng cây chuyển gen đều thu được băng DNA có kích thước khoảng 1,51 kb, tương ứng với gen *EXPI* trong cây đậu tương và hai dòng cây chuyển gen xuất hiện băng DNA có kích thước khoảng 0,79 kb tương ứng với kích thước gen chuyển *GmEXPI*. Như vậy trong ba dòng đậu tương chuyển gen sống sót trên giá thể ở nhà lưới đã có hai dòng có phản ứng dương tính với PCR, đó là dòng số 1 ( $T_{01}$ ) và dòng số 3 ( $T_{03}$ ).

Căn cứ vào tổng số mẫu biến nạp và số cây dương tính với PCR hiệu suất chuyển gen được xác định và kết quả được trình bày ở bảng 3.3.

**Bảng 3.3.** Hiệu suất chuyển gen *GmEXPI* ở giống đậu tương DT84

Số mẫu biến nạp	Số cây dương tính với PCR	Hiệu suất chuyển gen
530	2	0,38%

Bảng 3.3 cho thấy trong tổng số 530 mẫu biến nạp có 2 cây dương tính với PCR và hiệu suất chuyển gen ở thế hệ  $T_0$  là 0,38%.

Nghiên cứu chuyển gen ở cây đậu tương thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* đã được Trần Thị Cúc Hòa và cs (2007) tiến hành trên giống đậu



tương William [3]. Cũng bằng phương pháp chuyển gen qua nách lá mầm hạt chín đậu tương nhờ *A. tumefaciens*, Nguyễn Thị Thúy Hương (2011) trong 1262 mẫu biến nạp ở giống đậu tương DT84 thu được 3 dòng cây dương tính với PCR, hiệu suất là 0,24% [5]; Nguyễn Thu Hiền (2011) biến nạp cấu trúc chứa đoạn gen *HA1* của virus H5N1 vào 650 mẫu lá mầm của giống đậu tương DT12 thu được 8 dòng cây dương tính với PCR tương ứng với hiệu suất chuyển gen là 1,23% [4]; trong kết quả nghiên cứu của Lò Thị Mai Thu (2014), hiệu suất chuyển gen đối với cấu trúc RNAi ở giống DT12 là 1,35%, ở giống DT2008 là 2,24%; Kết quả nghiên cứu của Lò Thanh Sơn (2015) trên giống đậu tương DT84 xác định hiệu suất chuyển gen là 0,27% [10]. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi bước đầu xác định được hiệu suất chuyển gen ở thể hệ  $T_0$  là 0,38% phù hợp với các nghiên cứu chuyển gen ở các giống đậu tương Việt Nam.

Mùa vụ gieo trồng đậu tương thích hợp nhất là vụ xuân, xuân hè và hè thu [12], mặt khác đậu tương là loại cây trồng có hạt chứa hàm lượng protein và lipid cao, khả năng tái sinh *in vitro* rất khó. Kỹ thuật chuyển gen gián tiếp nhờ lây nhiễm *A. tumefaciens* qua nách lá mầm hạt chín có thể đã ảnh hưởng đến hiệu suất chuyển gen và làm cho tỷ lệ các cây đậu tương mang gen chuyển thấp. Như vậy có thể thấy rằng hiệu suất chuyển gen ở cây đậu tương chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố, trong đó có đặc điểm về thành phần hóa học trong hạt đậu tương. Hiệu suất chuyển gen ở đậu tương không chỉ phụ thuộc vào khả năng tiếp nhận gen của kiểu gen cây đậu tương, mà còn phụ thuộc vào đặc điểm của cấu trúc gen được chuyển vào cây đậu tương. Từ những nguyên nhân này có thể cho rằng, để nâng cao hiệu suất chuyển gen gián tiếp qua *A. tumefaciens* ở cây đậu tương cần tăng số mẫu biến nạp, cải tiến kỹ thuật biến nạp, chọn lọc *in vitro* và chú ý đến mùa vụ ra cây ở môi trường tự nhiên.



# KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

## 1. KẾT LUẬN

1.1. Cấu trúc pCB301-*GmEXPI* đã được biến nạp thành công vào mô nách lá mầm hạt chín của giống đậu tương DT84 bằng phương pháp chuyển gen gián tiếp qua chủng vi khuẩn *A. tumefaciens*.

1.2. Các mẫu biến nạp đã được tái sinh *in vitro*, chọn lọc và tạo được ba dòng cây đậu tương chuyển gen sống sót ở điều kiện nhà lưới trong tổng số 530 mẫu biến nạp, chiếm tỷ lệ 0,57%.

1.3. Phân tích sự có mặt của gen chuyển trong các dòng cây chuyển gen ở thế hệ T<sub>0</sub> thu được 2 cây dương tính với PCR và hiệu suất chuyển gen là 0,38%.

## 2. ĐỀ NGHỊ

Cần tiếp tục theo dõi, phân tích biểu hiện của gen chuyển *Gm EXPI* ở hai dòng cây chuyển gen (T<sub>0</sub>1 và T<sub>0</sub>3) ở thế hệ T<sub>1</sub> và các thế hệ tiếp theo phục vụ công tác chọn giống đậu tương chịu hạn.



## TÀI LIỆU THAM KHẢO

### Tài liệu tiếng Việt

1. Ngô Thế Dân, Trần Đình Long, Trần Văn Lại, Đỗ Thị Dung, Phạm Thị Đào (1999), *Cây đậu tương*, Nxb Nông nghiệp Hà Nội.
2. Trần Quốc Dung, Nguyễn Hoàng Lộc, Trần Thị Lệ (2006), *Công nghệ chuyển gen*, NXB Đại học Huế.
3. Trần Thị Cúc Hoà (2007), "Tạo chọn giống đậu tương biến đổi gen kháng sâu ở Việt Nam", *Tuyển tập Kết quả nghiên cứu Khoa học Công nghệ 2006 - 2010*, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam, 214 - 220.
4. Nguyễn Thu Hiền, Chu Hoàng Mậu, Chu Hoàng Hà, Lê Văn Sơn (2011), "Nghiên cứu khả năng tái sinh và biến nạp gen qua rách lá mầm của hai giống đậu tương (*Glycine max* L.) ĐT12 và DT84 bằng *Agrobacterium*", *Tạp chí Công nghệ sinh học*, 8(38): 1305-1310.
5. Nguyễn Thị Thúy Hường (2011), *Phân lập, tạo đột biến điểm ở gen P5CS liên quan đến tính chịu hạn và thử nghiệm chuyển vào cây đậu tương Việt Nam*, Luận án tiến sĩ sinh học, Đại học Thái Nguyên.
6. Nguyễn Thị Thúy Hường, Trần Thị Ngọc Diệp, Nguyễn Thu Hiền, Chu Hoàng Mậu, Lê Văn Sơn, Chu Hoàng Hà (2009), "Phát triển hệ thống tái sinh invitro ở cây đậu tương (*Glycine max* L. Merrili) phục vụ chuyển gen", *Tạp chí khoa học và công nghệ Đại học Thái Nguyên*, 52(4): 82-88.
7. Trần Thị Phương Liên (1999), *Nghiên cứu đặc tính hoá sinh và sinh học phân tử của một số giống đậu tương có khả năng chịu nóng, chịu hạn ở Việt Nam*, Luận án tiến sĩ Sinh học, Viện Công nghệ Sinh học, Hà Nội.
8. Trần Thị Phương Liên (2010), *Protein và tính chịu chống chịu ở thực vật*, Nxb Khoa học tự nhiên và công nghệ, Hà Nội.



9. Lò Thanh Sơn, Hồ Mạnh Tường, Lê Văn Sơn, Nguyễn Vũ Thanh Thanh, Chu Hoàng Mậu (2013), “Nghiên cứu đặc điểm gen *GmEXP1* liên quan đến sự kéo dài rễ phân lập từ một số giống đậu tương địa phương Sơn La (*Glycine max* (L.) Merrill)”, *Hội nghị Khoa học Công nghệ sinh học toàn quốc 2013*, Quyển 1, Nxb Khoa học tự nhiên và công nghệ, Hà Nội, 192 - 196.
10. Lò Thanh Sơn (2015), *Nghiên cứu đặc điểm và chuyển gen GmEXP1 liên quan đến sự phát triển bộ rễ của cây đậu tương (Glycine max (L.) Merrill)*. Luận án tiến sĩ sinh học, Đại học Thái Nguyên.
11. Chu Hoàng Mậu, Nguyễn Thị Thúy Hương, Chu Hoàng Hà, Nguyễn Vũ Thanh Thanh (2011), *Gen và đặc tính chịu hạn của cây đậu tương*, Nxb Đại học Quốc Gia Hà Nội.
12. Phạm Văn Thiều, (2008), *Cây đậu Tương - Kỹ thuật trồng và chế biến sản phẩm*, NXB Nông nghiệp Hà Nội.

### **Tài liệu tiếng anh**

13. Gelvin S.B., (2010), “Plant proteins involved in *Agrobacterium* mediated genetic transformation”, *Annu Rev Phytopathol.* 48: 45-68.
14. Gelvin S.B., (2003), “*Agrobacterium* and plant transformation: The biology behind the “gene-jockeying” tool”, *Microbiol Mol Biol*, 67(1): 16-37.
15. Guo W., Zhao J., Li X., Qin L., Yan X., Liao H., (2011), “A soybean  $\beta$ -expansin gene *GmEXPB2* intrinsically involved in root system architecture responses to abiotic stresses”. *Plant J.* 66(3): 541-552.



16. Lee D.K., Ahn J.H., Song S.K., Choi Y.D., Lee J.S. (2003), "Expression of an Expansin Gene Is Correlated with Root Elongation in Soybean", *Plant Physiology* 131: 985 - 997.
17. Hong H. P., Zhang H., Olhoft P., Hill S., Wiley H., Toren E., Hillebrand H., Jones T., Cheng M. (2007), "Organogenic callus as the target for plant regeneration and transformation via *Agrobacterium* in soybean (*Glycine max* (L) Merr)", *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*, 43, pp. 558 - 568.
18. Liao Y., Zou H.F., Wang H.W., Zhang W.K., Ma B., Zhang J.S., Chen S.Y., (2008), "Soybean GmMYB76, GmMYB92, and GmMYB177 genes confer stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* plants". *Cell Res.* 18(10): 1047–1060.
19. Li Y., Darley C. P., Ongaro V., Freming A., Schipper O., Baldauf S. L., McQueen, Mason S. J., (2002). "Plant expansins are a complex multigene family with an ancient evolutionary origin". *J. Plant Physiol.* 128 (3): 854-864.
20. Lo Thanh Son, Le Van Son, Nguyen Vu Thanh Thanh, Chu Hoang Mau (2014), "Cloning and designing vector carrying *GmEXPI* gene isolated from local soybean cultivar Sonla, Vietnam", *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics (IJBBB)* 4 (3): 191 - 194.
21. Margine M.Paz, Huixia S., Zibiao G., Zhanyuan Z., Anjan K.B., Wang K., (2004), "Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant", *Euphytica* 136: 167-169
22. McQueen-Mason S., Durachko D. M., Cosgrove D. J. (1992), "Two endogenous proteins that induce cell wall extension in plants", *Plant Cell Online*, 4(11), pp. 1425 - 1433.



23. Olhoft, P.M., D.A. Somers, (2001), “L-Cysteine increases *Agrobacterium* mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary node cells”, *Plant Cell Rep.* 20: 706-711.
24. Paz M.M., Shou H., Guo Z., Zhang Z., Anjan K., Banerjee and Wang K., (2004), “Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant”, *Euphytica* 136: 167-179.
25. Saghai M. M. A., Soliman K. M., Jorgensen R. A., Allard R. W., (1984), “Ribosomal DNA spacer - length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics”, *Proc Natl Acad Sci USA* 81: 8014-8018.
26. Tran Thi Cuc Hoa, Tran Vu Hai, La Cao Thang, (2008), “Transformation efficiencies of the soybean variety PC19 [*Glycine max* (L.) Merrill] using *Agrobacterium tumefaciens* and the cotyledonary node method”, *Omonrice* 16: 1-8.
27. Wiebke-Strohm B., Pasquali G., Margis-Pinheiro M., Bencke M., Bucker-Neto M., Becker-Ritt A.B., Martinelli A.H.S., Polacco J.C., Stolf R., Marcelino F.C., (2012), “Ubiquitous urease affects soybean susceptibility to fungi”, *Plant Mol Biol.* 79: 75-87.