

NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM CỦA GEN LIÊN QUAN ĐẾN SỰ PHÁT TRIỂN BỘ RỄ NHẪM PHỤC VỤ CHUYỂN GEN Ở CÂY ĐẬU TƯƠNG

TỔNG QUAN

TỔNG QUAN TÌNH HÌNH NGHIÊN CỨU THUỘC LĨNH VỰC CỦA ĐỀ TÀI Ở TRONG VÀ NGOÀI NƯỚC Tổng quan tình hình nghiên cứu Đậu tương (*Glycine max* (L.) Merrill) là cây công nghiệp ngắn ngày được trồng phổ biến ở nhiều quốc gia trên thế giới bởi giá trị kinh tế, dinh dưỡng cao, cây cải tạo đất. Nghiên cứu đặc tính chịu hạn về mặt sinh lý, hoá sinh và cấu trúc tế bào, người ta nhận thấy hàng loạt những biến đổi ở những mức độ khác nhau trong các giai đoạn phát triển khác nhau, liên quan đến sản phẩm biểu hiện của nhiều gen và cho đến nay chưa tìm được một gen cụ thể nào thực sự giữ vai trò quyết định tính chịu hạn của cây trồng. Nghiên cứu cơ sở sinh lý, hóa sinh và sinh học phân tử của đặc tính chịu hạn của cây đậu tương thể hiện ở ba nội dung chính sau đây: (1) Khả năng thích nghi của bộ rễ trong điều kiện hạn 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) Đáp ứng về phương diện hóa sinh và sinh học phân tử của cây đậu tương trong điều kiện hạn hán. Trong đó nghiên cứu bản chất phân tử của mối liên quan giữa sự phát triển và khả năng đâm xuyên của bộ rễ với khả năng chịu hạn của cây đậu tương còn ít được quan tâm nghiên cứu.

Khả năng thích nghi của bộ rễ trong điều kiện hạn Bộ rễ là một trong những bộ phận 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. 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 (Taylor và đtg 1978). Bên cạnh đó hệ thống rễ sợi phát triển cũng giúp cho cây có thể vươn tới các lớp đất có độ ẩm cao và tìm kiếm các chất dinh dưỡng. 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. Kaspar và đtg (1984) đã đánh giá 105 giống đậu tương khác nhau cho thấy tỉ số kéo dài rễ trụ khác nhau giữa các giống vào khoảng 1,3 cm/ngày. 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 không được tưới nước thì bộ rễ có chiều dài hơn hẳn ở cây đậu tương được tưới nước (Huck và đtg 1983), 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 tổng số, cấu trúc và số lượng rễ nhánh ở các giống chịu hạn. Những tính trạng này thường được dùng như các chỉ tiêu quan trọng 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. Trong một nghiên cứu khác cho thấy cây đậu tương khi bị xử lý hạn ở giai đoạn

trước khi ra hoa sẽ cho năng suất cao hơn những cây đậu tương bị xử lý hạn ở giai đoạn sau khi nở hoa, điều này được giải thích là do chúng đã phát triển bộ rễ đầy đủ để thích ứng với điều kiện hạn trước khi nở hoa (Hirasawa và đtg 1994). 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. Tuy nhiên, các phương pháp đo đạc các tính trạng liên quan đến bộ rễ thường rất khó thực hiện. Thay vào đó các phương pháp phân tử sẽ là công cụ hỗ trợ cho các phương pháp truyền thống để nghiên cứu các tính trạng về rễ. Quá trình chọn lọc các gen liên quan đến các tính trạng về rễ bao gồm các nghiên cứu sàng lọc gen từ các cơ sở dữ liệu, thiết kế môi để nhân bản gen, xác định sự đa dạng, phát triển phương pháp phân tích hệ gen, xác định quần thể nghiên cứu. Phương pháp này đã thành công trong việc xác định nhiều gen quy định các tính trạng rễ ở lúa trong điều kiện hạn (Valliyodan và đtg 2006). Thêm vào đó, việc hiểu biết các cơ chế sinh lý và quá trình điều hòa di truyền của sự thích nghi của bộ rễ dưới điều kiện hạn sẽ giúp ích cho việc xác định các gen đặc hiệu, các quá trình chuyển hóa để sử dụng cho việc nâng cao khả năng chịu hạn của cây đậu tương bằng phương pháp sử dụng chỉ thị gen hoặc kỹ thuật chuyển gen. Ở Việt Nam, cây đậu tương được trồng cả 7 vùng nông nghiệp trên cả nước. Các giống đậu tương ở nước ta rất đa dạng và phong phú, đặc biệt nguồn gen của tập đoàn các giống đậu tương địa phương. Đậu tương thuộc nhóm cây chịu hạn kém, do vậy nhiều nhà khoa học đã quan tâm nghiên cứu nhằm cải thiện, nâng cao khả năng chịu hạn của cây đậu tương bằng các biện pháp kỹ thuật truyền thống khác nhau (Nguyễn Huy Hoàng, 1992, Maitra và đtg., 1994; Lê Trọng Quang và đtg., 1994; Chu Hoàng Mậu và đtg., 2001), nghiên cứu gen liên quan đến tính chịu hạn của các cây họ Đậu đã được thực hiện bởi nhóm nghiên cứu của Đại học Thái Nguyên và một số tác giả khác (Chu Hoàng Mậu và Nguyễn Vũ Thanh Thanh và đtg., 2006, 2007, 2008, 2009, 2010, 2011), (Trần Thị Phương Liên và đtg., 1999). Tuy nhiên, nghiên cứu khả năng chịu hạn của cây đậu tương trên cơ sở phân tích sự phát triển và khả năng đâm xuyên của rễ và các gen liên quan đến đặc tính này đang là điều mới mẻ trên thế giới và ở Việt Nam. Khả năng cố định nitơ của cây đậu tương trong điều kiện hạn 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 CO₂, 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 (Purcell và đtg 1996). 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 O₂ giảm, nguồn carbon tới các nốt sần giảm, hoạt tính của enzym sucrose synthase giảm, hàm lượng ure và axit amin tự do tăng (King và Purcell, 2005). Đặc biệt, mối quan hệ về thế năng nước của lá và nốt sần đã được xác định ở cây đậu tương trong điều kiện hạn. Hoạt tính của enzym nitrogenase giảm 70% trong 4 ngày đầu tiên khi cây gặp hạn, trong khi đó quá trình quang hợp giảm khoảng 5%. Ngoài ra, sự thiếu hụt về nước cũng ảnh hưởng trực tiếp đến hoạt tính của nốt sần thông qua sự tăng cường tính kháng đối với khả năng khuếch tán oxy. Tình trạng thiếu nước ở trong đất cũng dẫn tới sự tích lũy ure ở lá của cây đậu tương và hậu quả này chính là một nhân tố ức chế quá trình hình thành nốt sần. Sự thay đổi về di truyền cũng được xác định ở các cá thể nhạy cảm với khả năng cố định nitơ trong điều kiện hạn. Nghiên cứu của Sinclair và đtg (2007) cho thấy quá trình dị hóa ure không phụ thuộc vào mangan và giống đậu tương kháng hạn có khả năng cố định nitơ cao. Nhiều nghiên cứu cũng đang được thực hiện theo hướng làm sáng tỏ bản chất phân tử các nhân tố hạn chế và điều hòa quá trình cố định nitơ trong điều kiện hạn ở cây đậu tương. Danh mục các công trình đã công bố thuộc lĩnh vực của đề tài của chủ nhiệm và những thành viên tham gia nghiên cứu (họ và tên tác giả; bài báo; ấn phẩm; các yếu

tổ về xuất bản)1. Chu Hoang Mau, Nguyen Thi Thuy Huong, Nguyen Tuan Anh, Chu Hoang Lan, Le Van Son, Chu Hoang Ha (2010), Characteristics of the gene encoding pyrroline-5-carboxylate synthase (P5CS) in Vietnam soybean cultivars (*Glycine max* L. Merrill). Proceedings of 2010 International Conference on Biology, Environment and Chemistry (ICBEC 2010), 28-30, December 2010, Hong Kong, IEEE: 319-323.2. Chu Hoang Lan, Nguyen Tuan Anh, Nguyen Vu Thanh Thanh, Nguyen Hiep Hoa, Chu Hoang Mau (2010), Characterization of the GmDREB5 gene isolated from the soybean cultivar Xanh Tiendai, Vietnam. Proceedings of 2010 International Conference on Biology, Environment and Chemistry (ICBEC 2010), 28-30, December 2010, Hong Kong, IEEE: 354-358.3. Chu Hoang Mau, Nguyen Tuan Anh, Pham Thi Thanh Nhan, Dinh Thi Ngoc, Bui Thi Tuyet (2010), The characteristics of chaperonin gene isolated local soybean cultivars (*Glycine max* L. Merrill) grown in Tay Nguyen region, Viet Nam. Proceedings of 2010 International Conference on Chemical Engineering and Applications (CCEA 2010), Singapore, 452-456.4. Chu Hoang Mau, Nguyen Tuan Anh, Nguyen Thu Hien, Nguyen Vu Thanh Thanh, Study gen inresponse to local drought soybean cultivar (*Glycine max* (L.) Merrill in the northern mountainous region of Vietnam. 5th International Crop Science Congress (5th ICSC), Jeju, Korea - 4/2008.5. Chu Hoàng Mậu, Nguyễn Vũ Thanh Thanh, Nguyễn Thị Minh Hồng, Hoàng Văn Mạnh (2011), ặc điểm của gen DREB1 phân lập từ giống đậu tương địa phương (*Glycine max* L. Merrill) Xanh lơ Ba Bể - Bắc Kạn. Tạp chí Sinh học 33(1).6. Vũ Thị Thu Thủy, Nguyễn Thị Tâm, Chu Hoàng Mậu, Nguyễn Vũ Thanh Thanh (2011), Nghiên cứu trình tự gen cystatin của một số dòng lạc có nguồn gốc từ mô sẹo chịu chiếu xạ và xử lý mất nước. Tạp chí Sinh học 33(1).7. Nguyễn Thúy Hoàng, Chu Hoàng Mậu, Nguyễn Hữu Cường, Lê Văn Sơn, Chu Hoàng Hà (2010), Tạo cây thuốc lá chuyển gen P5CS đột biến loại bỏ hiệu ứng phản hồi ngược, làm tăng hàm lượng prolin và khả năng chống chịu khô hạn. Tạp chí Công nghệ sinh học 8 (3A): 539-544.8. Chu,M.H., Nguyen,T.V.T., Nguyen,H.H., Nguyen,N.T.B. and Chu,L.H. (2011), *Glycine max* cv. Xanh tiendai partial mRNA for drought responsive element binding protein 5 (DREB5 gene), GenBank, Accession FR822737.19. Nguyen,T.V.T., Chu,M.H., Hoang,M.V. and Nguyen,H.T.M. (2011), *Glycine max* cv. Xanh lơ-Ba Bể DREB1 gene for drought responsiv element binding protein 1. GenBank, Accession FR822736.10. Vu,T.T.T., Nguyen,T.T., Chu,M.H. and Nguyen,T.V.T.(2011, Cystatin gene sequence from callus treated with irradiation and dehydration of L18 cultivar. GenBank: FR82880311. Vu,T.T.T., Nguyen,T.V.T., Chu,M.H. and Nguyen,T.T. (2010), *Arachis hypogaea* cystatin gene 1, exons 1-2. GenBank: FN811133.112. Vu,T.T.T., Nguyen,T.T., Chu,M.H. and Nguyen,T.T.V. (2010), *Arachis hypogaea* cystatin gene for cystein proteinase inhibitor, cultivar L18. GenBank: FR745399.113. Vu,T.T.T., Chu,M.H., Nguyen,T.T.V. and Nguyen,T.T. (2010), *Arachis hypogaea* cystatin gene for cystein proteinase inhibitor, cultivar L23. GenBank: FR691053.14. Chu,M.H., Dinh,N.T., Bui,T.T. and Pham Thi,N.T. (2009), *Glycine max* cctd gene for cytosolic chaperonin, delta subunit, cultivar Duylinh2-lamDong, EMBL GenBank, Accession FN435627.115. Chu,M.H., Dinh,N.T., Bui,T.T. and Pham Thi,N.T. (2009), *Glycine max* cctd gene for cytosolic chaeronin, delta subunit, cultivar Dilinh1, EMBL GenBank, Accession FN435626.116. Chu,M.H., Dinh,N.T., Bui,T.T. and Pham Thi,N.T. (2009), *Glycine max* cctd gene for cytosolic chaperoin, delta subunit, cultivar NH9, EMBL GenBank, Accession FN435625.117. Chu,M.H. and Nguyen,H.T.T. (2009), *Glycine max* mRNA for hypothetical protein (p5CS gene), isolate Yen Chau - Son La (SL6), EMBL GenBank, Accession FN564571.118. Chu,M.H. and Nguyen,H.T.T. (2009), *Glycine max* mRNA for hypothetical protein (p5CS gene), solate Muong La - Son La (SL1), EMBL GenBank, Accession

FN564570.119. Nguyen,H.T.T., Chu,M.H., Le,S.V., Nguyen,C.H. and Chu,H.H. (2009), Glycine max mRNA for hypothetical protein (p5CS gene), isolate Song Ma-Son La (SL5), EMBL GenBank, Accession FM999729.120. Nguyen,H.T.T., Chu,M.H., Le,S.V., Nguyen,C.H. and Chu,H.H. (2009), Glycine max mRNA for hypothetical protein (p5CS gene), isolate DT84, EMBL GenBank, Accession FM999730.21. Chu, M.H. and Nguyen, H.T (2007), Glycine max LEA-D11 gene for dehydrin, cultivar VMK, EMBL GenBank, Accession AM421515.22. Chu, M.H. and Nguyen, H.T (2007), Glycine max LEA-2-D11 gene for dehydrin, cultivar CB4, EMBL GenBank, Accession AM420412.

MỤC TIÊU

Xác định được sự khác biệt về đặc điểm, khả năng đâm xuyên của bộ rễ trong điều kiện hạn hán và mối liên quan giữa cấu trúc gen với sự phát triển bộ rễ cây đậu tương; Tạo được vector chuyển gen mang cấu trúc gen liên quan đến sự phát triển rễ đậu tương

NỘI DUNG

- Đánh giá khả năng chịu hạn của các giống đậu tương trên phương diện sự phát triển bộ rễ, khả năng đâm xuyên của rễ và số lượng nốt sần. Phân nhóm đậu tương dựa trên phương diện phát triển bộ rễ.- So sánh hàm lượng protein, lipid trong hạt và rễ thuộc hai nhóm đậu tương khác biệt về sự phát triển bộ rễ.- Phân lập gen liên quan đến sự phát triển bộ rễ và khả năng đâm xuyên của rễ từ hệ gen của các giống đậu tương nghiên cứu. Đánh giá sự khác biệt về cấu trúc gen liên quan đến sự phát triển bộ rễ của hai nhóm đậu tương.- Thiết kế vector mang cấu trúc gen liên quan đến tính trạng rễ cây đậu tương. Đánh giá hoạt động của vector chuyển gen ở cây thuốc lá mô hình hoặc cây đậu tương.

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Cách tiếp cậnNghiên cứu tìm biện pháp cải thiện khả năng chịu hạn của cây đậu tương để rút ngắn thời gian chọn lọc và nâng cao hiệu quả chọn giống bằng kỹ thuật gen: Xác định mối liên quan giữa sự thay đổi cấu trúc gen với sự phát triển, khả năng đâm xuyên của bộ rễ đậu tương bằng kỹ thuật sinh học phân tử và kỹ thuật gen phục vụ việc cải thiện khả năng chịu hạn ở cây đậu tương.

Phương pháp nghiên cứu(i) Phương pháp đánh giá khả năng chịu hạn thông qua sự phát triển, khả năng đâm xuyên của bộ rễ của đậu tương ở giai đoạn cây non;(ii) Phương pháp sinh học phân tử: tách chiết DNA, RNA tổng số, PCR, tách dòng và xác định trình tự gen liên quan đến khả năng phát triển và khả năng đâm xuyên của bộ rễ;(iii) Phương pháp phân tích hoá sinh: phân tích hàm lượng protein, lipid... ở hạt và ở rễ. (iv) Thiết kế vector chuyển gen theo phương pháp Gateway. Đánh giá hoạt động của vector ở cây mô hình hoặc cây đậu tương;(v) Phương pháp phân tích số liệu thống kê bằng phần mềm Excel. Phân tích trình tự gen bằng phần mềm BioEdit và DNASTAR. So sánh trình tự gen, trình tự amino acid của protein bằng phần mềm Megline và BioEdit.

HIỆU QUẢ KTXH

Hiệu quả về Giáo dục và đào tạo: (i) Kết quả nghiên cứu của đề tài là tài liệu khoa học sẽ được sử dụng trong giảng dạy các chuyên đề cho hệ đào tạo thạc sĩ; (ii) Góp phần đào tạo 01 nghiên cứu sinh, đào tạo 03 thạc sĩ và 02 đề tài NCKH của sinh viên; (iii) Kết quả đề tài là tài liệu minh hoạ cho giáo trình về Cách tiếp cận và Phương pháp công nghệ sinh học.

Hiệu quả về kinh tế - xã hội: (i) Chọn giống đậu tương chịu hạn bằng kỹ thuật gen rút ngắn được thời gian chọn lọc, nâng cao hiệu quả chọn giống;. (ii) Các giống đậu tương ưu việt được tuyển chọn là vật liệu chọn giống đậu tương chịu hạn, đáp ứng cho các vùng không chủ động được nước tưới.

ĐƠN VỊ SỬ DỤNG

Đơn vị sử dụng:

Khoa Sinh –Kỹ thuật nông nghiệp, Trường Đại học sư phạm-ĐH Thái Nguyên; Khoa Khoa học Sự sống, Trường Đại học Khoa học-ĐH Thái Nguyên