

**ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG CHỊU HẠN VÀ TÁCH DÒNG GIEN MÃ HOÁ
PROTEIN DEHYDRIN (LEA-D11) CỦA MỘT SỐ GIỐNG ĐẬU TƯƠNG
[*GLYCINE MAX* (L.) MERRILL] ĐỊA PHƯƠNG MIỀN NÚI**

CHU HOÀNG MẬU, NGUYỄN THU HIỀN

Đại học Thái Nguyên

Đậu tương [*Glycine max* (L.) Merrill] là loại cây trồng chiến lược của nhiều quốc gia trên thế giới. Hạt đậu tương có 32 - 40% protein, 12 - 25% lipit, chứa đầy đủ các loại axit amin không thay thế và nhiều loại vitamin (B1, B2, C, D, E, K...) [7]. Cây đậu tương có thời gian sinh trưởng ngắn, hệ rễ có nốt sần chứa vi khuẩn cố định đạm, vì thế cây đậu tương thường được trồng luân canh với lúa và ngô để tăng vụ và cải tạo đất bạc màu. Ở Việt Nam, cây đậu tương được gieo trồng ở cả 7 vùng nông nghiệp trong cả nước. Nguồn giống đậu tương ở nước ta hiện nay rất phong phú, bao gồm các giống nhập nội, giống lai tạo, giống đột biến và tập đoàn các giống địa phương. Các giống đậu tương địa phương phổ biến có năng suất thấp, nhưng lại có chất lượng hạt tốt và khả năng chống chịu với điều kiện ngoại cảnh bất lợi. Đậu tương là cây tương đối mẫn cảm với điều kiện ngoại cảnh và thuộc vào nhóm cây chịu hạn kém. Do vậy, ngoài mục đích chọn giống có năng suất cao thì việc tuyển chọn các giống đậu tương có kiểu gen chịu hạn ngày càng được quan tâm nghiên cứu [9, 10, 12, 14]. Cho đến nay đã có một số công trình tập trung tìm hiểu cơ sở hoá sinh và sinh học phân tử của các đặc tính chống chịu của cây đậu tương, đó là các nghiên cứu sự thay đổi hàm lượng protein và axit amin prolin ở thời điểm trước và sau khi cây bị hạn [5, 15, 17], nghiên cứu các nhóm protein, enzym trong hạt của một số giống đậu tương chịu nóng, chịu hạn khác nhau như protein dự trữ, proteaza, amylaza [12] và đặc biệt là nhóm protein chịu hạn LEA (Late embryogeneis abundant) [4]. LEA là loại protein được tổng hợp với số lượng lớn trong giai đoạn cuối của quá trình hình thành phôi, nó là một trong những nhóm protein quan trọng liên quan đến điều kiện mất nước của tế bào. Protein LEA giàu axit amin ưa nước, không

chứa cystein và tryptophan, có vùng xoắn α và có khả năng chịu nhiệt [4, 13], chúng thay thế vị trí nước trong tế bào và thực hiện các chức năng khác nhau, như cô lập ion, bảo vệ protein màng tế bào, phân huỷ protein biến tính và điều chỉnh áp suất thẩm thấu. Ngoài ra LEA không những điều chỉnh quá trình mất nước sinh lí khi hạt chín, mà còn hạn chế sự mất nước bắt buộc do các điều kiện ngoại cảnh bất lợi gây ra [4, 16].

Nhóm gen mã hoá loại protein LEA còn đóng vai trò quan trọng trong sự chịu khô hạn của hạt và liên quan đến khả năng chống hạn của cây. Khi hiện tượng mất nước xảy ra, gen LEA phiên mã tổng hợp một số lượng lớn mRNA trong hạt chín và bị phân giải hết trong quá trình nảy mầm. Mức độ phiên mã của gen LEA được điều khiển bởi axit abscisic (ABA) và độ mất nước của tế bào, áp suất thẩm thấu trong tế bào [4, 11].

Theo hướng nghiên cứu này, chúng tôi tiếp tục khảo sát khả năng chịu hạn và nghiên cứu sự đa dạng trong cấu trúc gen liên quan đến đặc tính này của một số giống đậu tương địa phương, làm cơ sở cho chương trình chọn giống đậu tương chịu hạn, góp phần bảo tồn và phát triển nguồn gen cây đậu tương địa phương miền núi.

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Sử dụng hạt của 9 giống đậu tương địa phương có chất lượng tốt do Trung tâm nghiên cứu và thực nghiệm đậu đỗ thuộc Viện Cây lương thực và thực phẩm - Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam cung cấp làm nguyên liệu nghiên cứu, đó là: Vàng Mường Khương (VMK), Quảng Hoà (QH), Cúc Hữu Lũng (HL), Lương Sơn (LS), Thanh Oai hạt đen (TOĐ), Vàng Cao Bằng (VCB), Cao Bằng 4 (CB4), Vàng Bắc Kạn (VBK), đối chứng là giống đậu tương DT93.

Đánh giá nhanh khả năng chịu hạn của các giống đậu tương ở giai đoạn cây non 3 lá chết bằng phương pháp gây hạn nhân tạo theo Lê Trần Bình và cs. (1998) [2]. Chỉ số chịu hạn tương đối được xác định dựa trên tỷ lệ cây không héo (CKH), tỷ lệ cây hồi phục (HP) và tỷ lệ chất khô của rễ (CK) sau các thời điểm 5, 7 ngày bị hạn.

Xác định hàm lượng protein theo phương pháp Lowry được mô tả trong tài liệu của Phạm Thị Trân Châu và cs. (1997) [6]; hàm lượng prolin được xác định theo Bates và cs. (1973) [1].

Phương pháp tách chiết ADN tổng số từ mầm đậu tương được tiến hành theo quy trình của Foolad và cs. (1995) [8].

Gien mã hoá protein dehydrin (LEA-D11) được nhân bản bằng kỹ thuật PCR với cặp môi MD1, MD2 được thiết kế theo công bố Cao Xuân Hiếu và cs. [11]. Cặp môi MD1, MD2 được tổng hợp tại hãng Invitrogen có trình tự như sau:

MD1: 5'-TCAAACCAACAACAACACTATGGC-3'

MD2: 5'-GCATCTACTTGTCACTGTGTCC-3'

PCR được tiến hành với 25 µl, trong đó có 2,5 µl đệm, 2 µl dNTP 10 mM, 2 µl môi xuôi và môi ngược 10 pmol/µl, 1 µl ADN khuôn 100 ng/µl, 0,4 µl *Taq* polymerase 5 U/µl, 17,1 µl H₂O. Chu trình nhiệt của PCR là: 94°C trong 3 phút; 30 chu kỳ với nhiệt độ: 94°C trong 1 phút, 55°C trong 50 giây, 72°C trong 1 phút 30 giây; 72°C trong 8 phút; lưu giữ ở 4°C.

Tách dòng gen dehydrin được tiến hành bằng cách gắn trực tiếp sản phẩm PCR vào

vector tách dòng pCR2.1 với việc sử dụng bộ sinh phẩm tách dòng của hãng Invitrogen. Phản ứng gắn có thành phần gồm 3,5 µl H₂O, 1 µl dung dịch đệm, 3 µl sản phẩm PCR, 1,5 µl vector pCR2.1, 1 µl T4 ligaza, sản phẩm gắn được biến nạp vào *E. coli* chủng DH5α. Các khuẩn lạc *E. coli* chứa vector tái tổ hợp mang sản phẩm PCR được chọn lọc trên môi trường LB chứa ampicilin, IPTG và Xgal.

Sử dụng enzym *EcoRI* để cắt kiểm tra vector tái tổ hợp, ở mẫu VMK chúng tôi lựa chọn plasmit dòng 1-4, mẫu CB4 chọn plasmit dòng 7, 8, 9. Thành phần phản ứng cắt gồm 5,3 µl H₂O, 1 µl buffer cho *EcoRI*, 3 µl ADN plasmit, 0,3 µl *EcoRI*. Mẫu cắt được ủ ở nhiệt độ 37°C trong thời gian 2 giờ. Sau đó sản phẩm cắt được kiểm tra bằng điện di trên gel agarosa 1% (hình 3).

Xác định trình tự nucleotit bằng thiết bị tự động ABI 3100 dựa trên nguyên tắc của phương pháp Sanger có sử dụng các dideoxynucleotit. Phân tích trình tự gen bằng phần mềm DNASTAR và BioEdit.

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

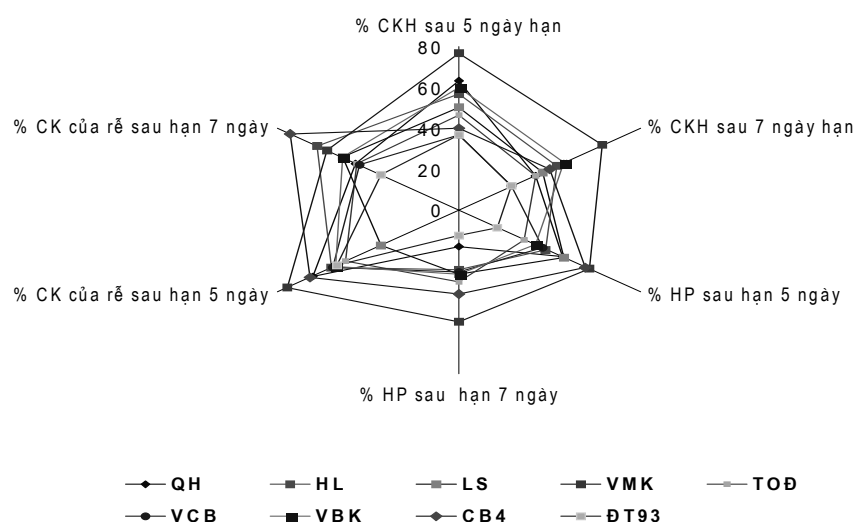
1. Khả năng chịu hạn của các giống đậu tương địa phương ở giai đoạn cây non

Kết quả phân tích các chỉ tiêu liên quan đến khả năng chịu hạn của một số giống đậu tương ở giai đoạn cây non 3 lá chết được trình bày ở bảng 1. Bảng 1 cho thấy, chỉ số chịu hạn tương đối của các giống đậu tương địa phương miền núi cao hơn giống ĐT93 và có thể xếp thứ tự từ cao đến thấp như sau: VMK > CB4 > HL > VBK > QH > LS > TOĐ > VCB > ĐT93.

Bảng 1

Tỷ lệ cây không héo (CKH), hồi phục (HP), chất khô (CK) của rễ và chỉ số chịu hạn tương đối của các giống đậu tương địa phương (n = 30)

Giống đậu tương	% CKH sau 5 ngày hạn	% CKH sau 7 ngày hạn	% HP sau hạn 5 ngày	% HP sau hạn 7 ngày	% CK của rễ sau hạn 5 ngày	% CK của rễ sau hạn 7 ngày	Chỉ số chịu hạn tương đối
QH	63,33	33,33	45,45	17,65	64,13	45,67	4928,27
HL	56,67	43,33	38,46	29,41	56,23	62,34	6038,47
LS	50,00	36,67	46,67	31,58	34,45	51,34	4521,38
VMK	76,67	63,33	57,14	54,55	75,89	57,86	10633,87
TOĐ	46,67	33,33	28,57	35,00	49,65	44,65	4133,64
VCB	36,67	23,33	36,84	30,43	55,67	43,67	3707,95
VBK	60,00	46,67	33,33	31,25	54,56	51,34	5622,12
CB4	40,00	40,00	55,56	40,91	65,67	74,22	7198,52
ĐT93	36,67	23,33	16,67	12,50	53,56	34,56	2269,21



Hình 1. Đồ thị biểu diễn khả năng chịu hạn của các giống đậu tương nghiên cứu

Chúng tôi tiến hành phân tích hàm lượng protein và hàm lượng prolin của cây đậu tương non ở thời điểm trước khi bị hạn và sau 5 ngày hạn (bảng 2).

Bảng 2

Hàm lượng protein và prolin của cây đậu tương non ở thời điểm trước và sau khi gây hạn

Giống	Hàm lượng protein			Hàm lượng prolin		
	Trước hạn (% khối lượng tươi)	Sau hạn (% khối lượng tươi)	Tỷ lệ giảm (%)	Trước hạn (% khối lượng tươi)	Sau hạn (% khối lượng tươi)	Tỷ lệ tăng (%)
QH	6,78 ± 0,63	5,23 ± 0,34	22,86	1,45 ± 0,04	5,03 ± 0,34	246,90
HL	6,34 ± 0,17	5,28 ± 0,45	16,72	1,03 ± 0,05	4,02 ± 0,42	290,29
LS	7,34 ± 0,45	6,98 ± 0,06	4,90	2,56 ± 0,05	3,46 ± 0,03	35,16
VMK	9,87 ± 0,21	8,34 ± 0,07	15,50	2,56 ± 0,13	7,78 ± 0,45	203,91
TOĐ	9,26 ± 0,23	7,67 ± 0,33	17,17	2,04 ± 0,32	3,14 ± 0,31	53,92
VCB	9,12 ± 0,07	6,89 ± 0,05	24,45	1,89 ± 0,41	2,87 ± 0,09	51,85
VBK	8,94 ± 0,67	7,34 ± 0,05	17,90	2,80 ± 0,29	4,98 ± 0,05	77,86
CB4	7,95 ± 0,02	7,34 ± 0,09	7,67	1,45 ± 0,31	4,47 ± 0,34	208,28
DT93	7,94 ± 0,34	6,81 ± 0,37	14,23	1,34 ± 0,32	2,67 ± 0,09	99,25

Trong điều kiện thiếu nước, enzym proteaza sẽ hoạt động một cách tích cực phân giải các protein đã bị biến tính và một số các protein phức tạp để tạo ra các polypeptit ngắn, tan trong môi trường nội bào tham gia điều chỉnh áp suất thẩm thấu của tế bào. Kết quả ở bảng 2 cho thấy, sau khi bị hạn, hàm lượng protein của các giống đậu tương đều giảm rõ rệt (giảm từ 4,90% đến 24,45%) và giống VCB có hàm lượng protein giảm mạnh nhất (24,45%). Hàm lượng prolin được tích lũy trong tế bào đã có sự tăng

lên sau khi cây bị hạn 5 ngày. Tùy từng giống mà hàm lượng prolin ở thời điểm hạn 5 ngày đã tăng so với thời điểm trước khi bị hạn từ 35,16% đến 290,29%. Các giống CB4, VMK, QH, HL có hàm lượng prolin trong cây tăng cao nhất và đều tăng trên 200%.

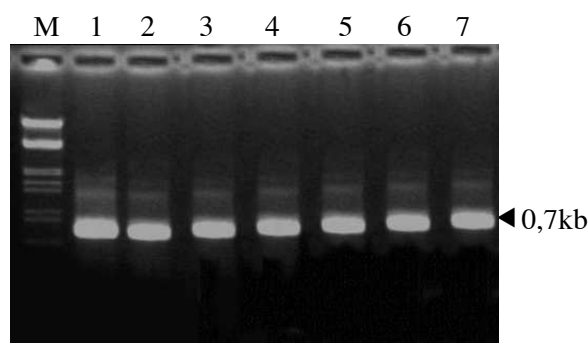
Prolin là một axit amin tham gia tích cực trong việc điều chỉnh áp suất thẩm thấu của tế bào. Prolin là một axit amin ưa nước có khả năng giữ và lấy nước cho tế bào, ngăn chặn sự xâm nhập của Na⁺, tương tác với protein màng

và lipit màng, ngăn chặn sự phá huỷ của màng và các phức protein khác. Hiện tượng tăng hàm lượng prolin khác nhau giữa các giống khi gặp hạn là cơ sở giải thích mức độ chịu hạn khác nhau giữa các giống đậu tương. Sự tăng nhanh về hàm lượng prolin và giảm hàm lượng protein của các giống đậu tương khi cây bị hạn đã chứng tỏ cây đậu tương có phản ứng một cách tích cực trước sự thay đổi điều kiện ngoại cảnh. Như vậy, nếu xét trên phương diện hoá sinh thì các giống đậu tương HL, QH, VMK, CB4 là những giống có khả năng chống hạn tốt nhất, giống QH có khả năng chịu hạn đứng thứ hai sau giống HL, nhưng nếu căn cứ vào chỉ số chịu hạn tương đối thì giống QH lại ở vị trí thứ năm. Vấn đề ở đây là khi xác định chỉ số chịu hạn tương đối, nghiên cứu này mới chỉ theo dõi tỷ lệ cây không héo, cây hồi phục sau các ngày hạn, trong khi còn rất nhiều chỉ tiêu khác chưa có điều kiện phân tích. Mặt khác tính chịu hạn của thực vật nói chung và của cây đậu tương nói riêng là tính trạng đa gen, do vậy để đánh giá một cách chính xác về khả năng chịu hạn của các giống đậu tương trên thì cần phải tiến hành phân tích thêm các chỉ tiêu sinh lý, hóa sinh liên quan đến tính chịu hạn ở giai đoạn cây đậu tương non.

2. Kết quả nhân gen dehydrin từ các giống đậu tương

Mâm 3 ngày tuổi của 7 giống đậu tương được nghiền mịn trong điều kiện nhiệt độ thấp, ADN của hệ gen được chiết rút khỏi tế bào nhờ dung dịch đệm có chứa Tris HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 10 mM; NaCl 100 mM, CTAB 4% và proteaza K với nồng độ 10 µl/ml. Từ 0,5 g mẫu mỗi loại chúng tôi thu được 200 µl dung dịch chiết ADN. Các mẫu ADN có độ tinh sạch được kiểm tra trên máy quang phổ ở bước sóng $\lambda = 260/280$ nm và có đỉnh cực đại ở bước sóng 260 nm. Sau đó dung dịch ADN lại kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarosa 0,8%, kết quả cho thấy ADN được tách chiết từ các giống đậu tương đều tương đối sạch, có thể sử dụng để nhân bản đoạn gen bằng kỹ thuật PCR.

Sử dụng ADN hệ gen làm khuôn để nhân gen mã hoá protein dehydrin (LEA - D11) bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi MD1, MD2, kết quả nhân gen dehydrin bằng PCR được hiện ở hình 2.



Hình 2. Điện di đoạn gen dehydrin được nhân bằng kỹ thuật PCR

M. thang ADN chuẩn (ADN λ cắt bằng HindIII và EcoRI); 1. VMK; 2. CB4; 3. VCB; 4. QH; 5. HL; 6. LS2; 7. DT93.

Hình ảnh điện di ở hình 2 cho thấy, ở cả 7 giống đậu tương chúng tôi đều nhận được sản phẩm PCR rất đặc hiệu. Kích thước phân tử vào khoảng 0,7 kb, tương ứng với vùng mang mã của gen dehydrin. Kích thước phân tử của sản phẩm PCR chúng tôi nhận được tương đương với kích thước phân tử của đoạn mang mã của cDNA của gen dehydrin và như vậy cả 7 giống đậu tương nghiên cứu đều có gen dehydrin và các gen này không chứa itron. Để khẳng định điều này, chúng tôi đã tiến hành tách dòng và xác định trình tự gen dehydrin của hai giống đậu tương địa phương Vàng Mương Khương (VMK) và Cao Bằng 4 (CB4).

3. Tách dòng sản phẩm PCR của hai giống đậu tương VMK và CB4

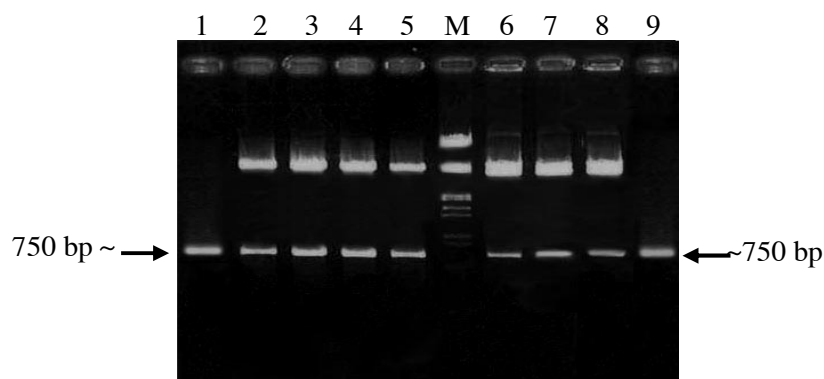
Sau khi nhân bản gen dehydrin có trong đậu tương và kiểm tra sản phẩm PCR bằng điện di trên gel agarosa 1%, chúng tôi đã chọn sản phẩm PCR của hai giống đậu tương VMK và CB4 (hai giống có khả năng chịu hạn tốt nhất) để tiến hành tách dòng gen. Tách dòng được thực hiện bằng cách gắn trực tiếp sản phẩm PCR của mẫu VMK và mẫu CB4 vào vector tách dòng pCR2.1 của hãng Invitrogen, sau đó biến nạp vào trực khuẩn *E. coli* rồi tách chiết lại plasmit để chọn loại tái tổ hợp mang đoạn ADN thuộc gen dehydrin.

Để chọn lọc dòng tế bào chủ mang plasmit tái tổ hợp chứa đoạn gen dehydrin cần tách dòng, chúng tôi chọn 13 khuẩn lạc (trong đó có 6 khuẩn lạc trắng của mẫu VMK, 6 khuẩn lạc

trắng của mẫu CB4 và 1 khuẩn lạc xanh), cấy mỗi khuẩn lạc trong 2 ml môi trường LB lỏng có bổ sung ampicilin để tiến hành tách chiết ADN plasmid. Các plasmid đã tách chiết được kiểm tra bằng điện di trên gel agarosa 1%.

Như trên đã trình bày, để khẳng định một cách chắc chắn việc gắn đoạn gen dehydrin vào vectơ tách dòng pCR2.1, chúng tôi đã sử dụng

enzim giới hạn *EcoRI* để cắt kiểm tra vectơ tái tổ hợp mang đoạn gen dehydrin, vì vectơ tách dòng pCR2.1 có hai vị trí cắt của *E. coRI* ở hai đầu của vùng cắt gắn đa vị. Nếu vectơ tái tổ hợp gắn được đoạn gen mong muốn thì sau khi cắt bằng enzym giới hạn *EcoRI*, plasmid tái tổ hợp sẽ văng ra một đoạn ADN dài khoảng 750 bp (hình 3).



Hình 3. Kết quả cắt kiểm tra plasmid tái tổ hợp bằng enzym *EcoRI*

Đường chạy 1. sản phẩm PCR của mẫu VMK; đường chạy 2-5. các dòng plasmid 1-4 của mẫu VMK; đường chạy M. ADN chuẩn cắt bằng *HindIII* và *EcoRI*; đường chạy 6-8. các dòng plasmid 7, 8, 9 của mẫu CB4; đường chạy 10. sản phẩm PCR của mẫu CB4.

Kết quả điện di cho thấy đoạn ADN được cắt văng ra khỏi vectơ tái tổ hợp có kích thước khoảng 750 bp xấp xỉ với kích thước của đoạn gen dehydrin cần tách dòng. Vì vậy, có thể khẳng định rằng chúng tôi đã chọn được 4 dòng plasmid tái tổ hợp (1-4) của mẫu VMK và 3 dòng plasmid tái tổ hợp (7, 8, 9) của mẫu CB4 có khả năng chứa đoạn gen dehydrin có kích thước khoảng 750 bp.

Để khẳng định một cách chắc chắn plasmid tái tổ hợp tách dòng mang đoạn gen dehydrin chúng tôi cần giải trình tự gen của các plasmid này. Chúng tôi lựa chọn plasmid dòng số 1 của mẫu VMK và plasmid dòng số 7 của mẫu CB4 để tinh sạch phục vụ cho mục đích xác định trình tự gen. Plasmid tái tổ hợp được tinh sạch bằng bộ sinh phẩm Miniprep Kit của hãng QIAGEN. Sau khi tinh sạch plasmid được kiểm tra bằng điện di trên gel agarosa 1%.

4. Kết quả phân tích trình tự gen dehydrin của hai giống đậu tương VMK và CB4

Plasmid tái tổ hợp sau khi được tinh sạch đã được sử dụng trong phản ứng xác định trình tự.

Sau khi xác định trình tự bằng thiết bị tự động ABI 3100, chúng tôi sử dụng phần mềm DNASTAR và BioEdit để phân tích trình tự gen. Kết quả phân tích cho thấy trình tự gen mã hoá dehydrin của mẫu VMK và mẫu CB4 mà chúng tôi đã xác định được dài 751 bp, trong đó gen dehydrin của giống đậu tương VMK có 226 A, 156 C, 214 G, 155 T; còn gen dehydrin của giống đậu tương CB4 có 227A, 155C, 214 G, 155 T.

Chúng tôi đã phân tích và so sánh trên ngân hàng dữ liệu gen quốc tế và thấy đoạn gen mà chúng tôi đã giải mã được chính là gen mã hoá cho dehydrin của đậu tương. Khi so sánh với 34 trình tự gen do các tác giả khác công bố trên ngân hàng dữ liệu gen quốc tế đều cho kết quả là các trình tự gen này đều bắt với gen dehydrin của giống đậu tương VMK và CB4 mà chúng tôi phân lập được [18].

Kết quả so sánh còn cho thấy, trình tự gen dehydrin của hai giống đậu tương VMK và CB4 mà chúng tôi phân lập được gần nhất với trình tự gen dehydrin phân lập từ bốn giống đậu tương M103, Cúc vàng, MV1C và V74 (hình 4) [18].

	10	20	30	40	50
VMK	TCAAAACCAA	CAACAACATAT	GGCAAGTTAT	CAGAAGCACT	ACGATGATCA	
CB4	TCAAAACCAA	CAACAACATAT	GGCAAGTTAT	CAGAAGCACT	ACGATGATCA	
CucVang	-----	-----AT	GGCAAGTTAT	CAAAAGCACT	ACGATGATCA	
M103	-----	-----AT	GGCAAGTTAT	CAGAAGCACT	ACGATGATCA	
MV1C	-----	-----AT	GGCAAGTTAT	CAAAAGCACT	ACGATGATCA	
V74	-----	-----AT	GGCAAGTTAT	CAGAAGCACT	ACGATGATCA	
	60	70	80	90	100
VMK	GGGTCGCAAG	GTCGACGAGT	ATGGCAATGT	TGAGAGGCAA	ACTGACGAAT	
CB4	GGGTCGCAAG	GTCGACGAGT	ATGGCAATGT	TGAGAGGCAA	ACTGACGAAT	
CucVang	GGGTCGCAAG	GTTGACGAGT	ATGGCAACGT	TGAGAAGCAA	ACCGACGAAT	
M103	GGGTCGCAAG	GTCGACGAGT	ATGGCAATGT	TGAGAGGCAA	ACTGACGAAT	
MV1C	GGGTCGCAAG	GTTGACGAGT	ATGGCAACGT	TGAGAAGCAA	ACCGACGAAT	
V74	GGGTCGCAAG	GTCGACGAGT	ATGGCAATGT	TGAGAGGCAA	ACTGACGAAT	
	110	120	130	140	150
VMK	ATGGCAACCC	GGTTCATGCC	ACTAGTGTCA	CTTATGTAGC	CACCAAAAGT	
CB4	ATGGCAACCC	GGTTCATGCC	ACTAGTGTCA	CTTATGTAGC	CACCAAAAGT	
CucVang	ACGGCAACCC	TGTTTCATGCT	GCTAGTGTCA	CCTATGTAGC	CACCAGAACT	
M103	ATGGCAACCC	GGTTCATGCC	ACTAGTGTCA	CTTATGTAGC	CACCAAAAGT	
MV1C	ACGGCAACCC	TGTTTCATGCT	GCTAGTGTCA	CCTATGTAGC	CACCAGAACT	
V74	ATGGCAACCC	GGTTCATGCC	ACTAGTGTCA	CTTATGTAGC	CACCAAAAGT	
	160	170	180	190	200
VMK	GTTG---GTG	GCTACAATGA	TGACGCTAAT	AAGCAACATG	ATATTACTGG	
CB4	GTTG---GTG	GCTACAATGA	TGACGCTAAT	AAGCAACATG	ATATTACTGG	
CucVang	GCTGCTGGTG	GTTACAGTGA	TGACATTAAT	AAGCAACATG	ATACCACCAA	
M103	GTTG---GTG	GCTACAATGA	TGACGCTAAT	AAGCAACATG	ATATTACTGG	
MV1C	GCTGCTGGTG	GTTACAGTGA	TGACATTAAT	AAGCAACATG	ATACCACCAA	
V74	GTTG---GTG	GCTACAATGA	TGACGCTAAT	AAGCAACATG	ATATTACTCG	
	210	220	230	240	250
VMK	TGTCTATCCC	GAAAAAGACA	CCGGTAGACA	TCATTTTGGT	CGTGGTTACG	
CB4	TGTCTATCCC	GAAAAAGACA	CCGGTAGACA	TCATTTTGGT	CGTGGTTACG	
CucVang	TGCCTA---C	GGCGTAGACA	CTGGTAGACA	GCATTCTAGT	GGTGGCTACG	
M103	TGTCTATCCC	GAAAAAGACA	CCGGTAGACA	TCATTTTGGT	CGTGGTTACG	
MV1C	TGCCTA---C	GGCGTAGACA	CTGGTAGACA	GCATTCTAGT	GGTGGCTACG	
V74	TGTCTATCCC	GAAAAAGACA	CCGGTAGACA	TCATTTTGGT	CGTGGTTACG	
	260	270	280	290	300
VMK	ACGGTGACAC	TAACAAGCAA	CATGATGCTA	CTGGTGTTTA	TCCCGBAATA	
CB4	ACGGTGACAC	TAACAAGCAA	CATGATGCTA	CTGGTGTTTA	TCCCGBAATA	
CucVang	ATGGTGACAC	TAATAAGCA-	-----	-----	-----	
M103	ACGGTGACAC	TAACAAGCAA	CATGATGCTA	CTGGTGTTTA	TCCCGBAATA	
MV1C	ATGGTGACAC	TAATAAACA-	-----	-----	-----	
V74	ACGGTGACAC	TAACAAGCAA	CATGATGCTA	CTGGTGTTTA	TCCCGBAATA	
	310	320	330	340	350
VMK	GACATTGGTA	GAGATCATGG	GACTACCGGT	GTTTATGGCC	TAAACACCGA	
CB4	GACATTGGTA	GAGATCATGG	GACTACCGGT	GTTTATGGCC	TAAACACCGA	
CucVang	-----	----TCATGG	AATTACTGGT	GGCTATAATG	ATGACACCAA	
M103	GACATTGGTA	GAGATCATGG	GACTACCGGT	GTTTATGGCC	TAAACACCGA	
MV1C	-----	----TCATGG	AACTACTGGT	GGCTATAATG	ATGACACCAA	
V74	GACATTGGTA	GAGATCATGG	GACTACCGGT	GTTTATGGCC	TAAACACCGA	
	360	370	380	390	400
VMK	CAGACATCAT	GGAAGTACTG	GTGTCAATCC	CGGGATAGAC	ACCCATAACC	
CB4	CAGACATCAT	GGAAGTACTG	GTGTCAATCC	CGGGATAGAC	ACCCATAACC	
CucVang	TAGACATCAT	GGAACTACCG	GTGTCTAT--	-GATATAGAC	ACCGATAGGC	
M103	CAGACATCAT	GGGAGTACTG	GTGTCAATCC	CGGGATAGAC	ACCCATAACC	
MV1C	TAGACATCAT	GGAACTACCG	GTGTCTAT--	-GGTATAGAC	ACCGATAGGC	
V74	CAGACATCAT	GGAAGTACTG	GTGTCAATCC	CGGGATAGAC	ACCCATAACC	
					

		410	420	430	440	450
VMK		AACAACATGG	GACTACCGGT	GGTTATGCTG	GTGACACTGG	AAGGCAGCAT
CB4		AACAACATGG	GACTACCGGT	GGTTATGCTG	GTGACACTGG	AAGGCAGCAT
CucVang		AACAACATGG	GACTACTGGT	GGCTATGCCG	GTGACACTGG	TAGGCAACAT
M103		AACAACATGG	GACTACCGGT	GGTTATGCTG	GTGACACTGG	AAGGCAGCAT
MV1C		AACAACATGG	GACTACTGGT	GGCTATGCCG	GTGACACTGG	TAGGCAACAT
V74		AACAACATGG	GACTACCGGT	GGTTATGCTG	GTGACACTGG	AAGGCAGCAT
	
		460	470	480	490	500
VMK		GGGAATACAG	GTGGCCCTTA	CTATGGAACC	GACACCGCGG	ACACAGGAGC
CB4		GGGAATACCG	GTGGCCCTTA	CTATGGAACC	GACACCGCGG	ACACAGGAGC
CucVang		GGGAACATCG	GTGGCCCTTA	CTATGGAACC	AACACCGCAG	ACACCGGTAC
M103		GGGAATACAG	GTGGCCCTTA	CTATGGAACC	GACACCGCGG	ACACAGGAGC
MV1C		GGGAACATCG	GTGGCCCTTA	CTATGGAACC	AACACCGCAG	ACACCGGTAC
V74		GGGAATACAG	GTGGCCCTTA	CTATGGAACC	GACACCGCGG	ACACAGGAGC
	
		510	520	530	540	550
VMK		CGGTCCCTAGA	AGTGGAACA	CCGGTGGCAC	CGGTTATGGA	GGCACTGGTG
CB4		CGGTCCCTAGA	AGTGGAACA	CCGGTGGCAC	CGGTTATGGA	GGCACTGGTG
M103		TGGTCCCAGA	AGTGGAACCA	CGGGCGGCAC	CGGTTATGGA	GGCACTGGTG
CucVang		CGGTTCCTGGA	AGTGGAACA	CCGGTGGCAC	CGGTTATGGA	GGCACTGGTG
MV1C		TGGTCCCAGA	AGTGGAACCA	CGGGCGGCAC	CGGTTATGGA	GGCACTGGTG
V74		GGGTGCTAGA	AGTGGAACA	CCGGTGGCAC	CGGTTATGGA	GCCACTGGTG
	
		560	570	580	590	600
VMK		GTACTGATTA	TGGAACAGCT	GGTGGCACTG	GTTATGGAAG	TGGAACTGGC
CB4		GTACTGATTA	TGGAACAGCT	GGTGGCACTG	GTTATGGAAG	TGGAACTGGC
CucVang		GCACTGATTA	TGGAACAAC	GGTGGCACTG	GTTATGGAAG	TGGAACTGGG
M103		GTACTGATTA	TGGAACAGCT	GGTGGCACTG	GTTATGGAAG	TGGAACTGGC
MV1C		GCACTGATTA	TGGAACAAC	GGTGGCACTG	GTTATGGAAG	TGGAACTGGG
V74		GTACTGATTA	TGGAACAGCT	GGTGGCACTG	GTTATGGAAG	TGGAACTGGC
	
		610	620	630	640	650
VMK		TATGGAATCA	ACACTGGGGG	TGCGCACACT	GAAGCAGGGT	ATGGGAAGGA
CB4		TATGGAATCA	ACACTGGGGG	TGCGCACACT	GAAGCAGGGT	ATGGGAAGGA
CucVang		TATGGAGTCA	ACACTGGGGG	TGCGCACACT	GAAGCAGGAT	ATAGGAAGGA
M103		TATGGAATCA	ACACTGGGGG	TGCGCACACT	GAAGCAGGGT	ATGGGAAGGA
MV1C		TATGGAGTCA	ACACTGGGGG	TGCGCACACT	GAAGCAGGAT	ATAGGAAGGA
V74		TATGGAATCA	ATACTGGGGG	TGCGCACACT	GAAGCAGGGT	ATGGGAAGGA
	
		660	670	680	690	700
VMK		GCATCGTCAG	CATGAGCAAT	CTCATGGTGG	TCAGCACGAG	AAGAAAGGGA
CB4		GCATCGTCAG	CATGAGCAAT	CTCATGGTGG	TCAGCACGAG	AAGAAAGGGA
CucVang		ACATCGTCAG	CATGACCAAT	CTCATGGTGA	TCAGAACGAG	AAGAAAGGGA
M103		GCATCGTCAG	CATGAGCAAT	CTCATGGTGG	TCAGCACGAG	AAGAAAGGGA
MV1C		ACATCGTCAG	CATGACCAAT	CTCATGGTGA	TCAAGACGAG	GAGAAAGGGA
V74		GCATCGTCAG	TATGAGCCAT	CTCATGGTGG	TCAGCACGAG	AAGAAAGGGA
	
		710	720	730	740	750
VMK		TACTAGACAA	GATTAAGGAG	AAGCTTCCTG	GAGGACACAG	TGACAAGTAG
CB4		TACTAGACAA	GATTAAGGAG	AAGCTTCCTG	GAGGACACAG	TGACAAGTAG
CucVang		TTATGGACAA	GATTAAGGAG	AAACTTCCTG	GAGGACACAG	TGACAAGTAG
M103		TACTGGACAA	GATTAAGGAG	AAGCTTCCTG	GAGGACACAG	TGACAAGTAG
MV1C		TTATGGACAC	GATTAAGGAG	AAGCTTCCTG	GAGGACACAG	TGGAAGTAG
V74		TACTGGACAA	GATTAAGGAG	AAGCTTCCTG	GAGGACACAG	TGACAAGTAG
					
VMK		ATGC				
CB4		ATGC				
CucVang		----				
M103		----				
MV1C		----				
V74		----				

Hình 4. So sánh trình tự gen dehydrin của các giống đậu tương VMK, CB4, M103, Cúc vàng, MV1C, V74

Đặc biệt, gen dehydrin của giống đậu tương VMK có 718 vị trí nucleotit giống với vị trí nucleotit của giống đậu tương V74 và có 724 vị trí nucleotit giống với vị trí nucleotit của giống đậu tương M103. Giống đậu tương CB4 có 725 vị trí nucleotit giống với vị trí nucleotit của giống đậu tương M103 và có 719 vị trí

nucleotit giống với vị trí nucleotit của giống đậu tương V74.

Kết quả xác định hệ số tương đồng và khoảng cách di truyền về gen dehydrin của 6 giống đậu tương VMK, CB4, M103, Cúc vàng, MV1C, V74 được thể hiện ở bảng 3.

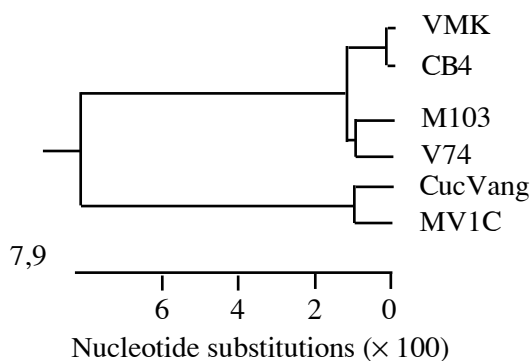
Bảng 3

Hệ số tương đồng (ma trận tam giác trên) và khoảng cách di truyền (ma trận tam giác dưới) của gen dehydrin của 6 giống đậu tương

		Hệ số tương đồng						
		VMK	CB4	CV	M103	MV1C	V74	
Khoảng cách di truyền	VMK		99,9	86,8	99,5	86,2	98,6	VMK
	CB4	0,1		86,9	99,3	86,3	98,5	CB4
	CV	14,9	14,7		86,0	98,4	85,6	CV
	M103	0,6	0,7	15,3		85,9	98,5	M103
	MV1C	15,6	15,4	1,6	16,0		85,0	MV1C
	V74	1,4	1,5	15,7	1,5	16,5		V74
		VMK	CB4	CV	M103	MV1C	V74	

Bảng 3 cho thấy gen dehydrin của hai giống VMK và CB4 có độ tương đồng là 99,9% và đạt mức độ tương đồng so với gen dehydrin của hai giống M103, V74 từ 98,5 - 99,5%, của hai giống Cúc Vàng, MV1C từ 86,2 - 86,8%. Khoảng cách di truyền giữa hai giống VMK và

CB4 là 0,1%, còn giữa hai giống VMK và CB4 với M103 và V74 từ 0,6 - 1,5%, với Cúc Vàng và MV1C từ 14,7 - 15,6%. Mối quan hệ di truyền của 6 giống đậu tương trên cơ sở phân tích gen dehydrin được thể hiện ở sơ đồ hình cây trên hình 5.



Hình 5. Sơ đồ hình cây về mối quan hệ di truyền của 6 giống đậu tương VMK, CB4, M103, Cúc Vàng, MV1C và V74

5. So sánh trình tự axit amin trong protein do gen dehydrin mã hóa của hai giống đậu tương VMK và CB4 với bốn giống đậu tương M103, Cúc Vàng, MV1C và V74

Kết quả so sánh trình tự axit amin trong protein do gen dehydrin mã hóa của hai giống đậu tương VMK và CB4 với bốn giống đậu tương M103, Cúc Vàng, MV1C và V74 được thể hiện ở hình 6.

									
		10	20	30	40	50				
VMK	MASYQKHYDD	QGRKVDEYGN	VERQTDEYGN	PVHATSVTYV	ATKS-VGGYN					
CB4	MASYQKHYDD	QGRKVDEYGN	VERQTDEYGN	PVHATSVTYV	ATKS-VGGYN					
CucVang	MASYQKHYDD	QGRKVDEYGN	VEKQTDEYGN	PVHAASVTYV	ATRТАAGGYS					
M103	MASYQKHYDD	QGRKVDEYGN	VERQTDEYGN	PVHATSVTYV	ATKS-VGGYN					
MV1C	MASYQKHYDD	QGRKVDEYGN	VEKQTDEYGN	PVHAASVTYV	ATRТАAGGYS					
V74	MASYQKHYDD	QGRKVDEYGN	VERQTDEYGN	PVHATSVTYV	ATKS-VGGYN					
									
		60	70	80	90	100				
VMK	DDANKQHDIТ	GVYPEKDTGR	HHFGRGYDGD	TNKQHDBTGV	YPGIDIGRDH					
CB4	DDANKQHDIТ	GVYPEKDTGR	HHFGRGYDGD	TNKQHDAТGV	YPGIDIGRDH					
CucVang	DDINKQHDIТ	NAYG-VDTGR	QHSSGGYDGD	TNKHHGITGG	YN-DDTNRHH					
M103	DDANKQHDIТ	GVYPEKDTGR	HHFGRGYDGD	TNKQHDAТGV	YPGIDIGRDH					
MV1C	DDINKQHDIТ	NAYG-VDTGR	QHSSGGYDGD	TNKHHGTТGG	YN-DDTNRHH					
V74	DDANKQHDIТ	RVYPEKDTGR	HHFGRGYDGD	TNKQHDAТGB	YPGIDIGRDH					
									
		110	120	130	140	150				
VMK	GTTGVYGLNT	DRHHGSTGVN	PGIDTHNQQH	GTTGGYAGDT	GRQHNGTGGGL					
CB4	GTTGVYGLNT	DRHHGSTGVN	PGIDTHNQQH	GTTGGYAGDT	GRQHNGTGGGL					
CucVang	GTTGVYDIDT	DR-----	-----QQH	GTTGGYAGDT	GRQHNGTGGGL					
M103	GTTGVYGLNT	DRHHGSTGVN	PGIDTHNQQH	GTTGGYAGDT	GRQHNGTGGGL					
MV1C	GTTGVYGIDT	DR-----	-----QQH	GTTGGYAGDT	GRQHNGTGGGL					
V74	GTTGVYGLNT	DRHHGSTGVN	PGIDTHNQQH	GTTGGYAGDT	GRQHNGTGGGL					
									
		160	170	180	190	200				
VMK	YYGTDТADTG	AGPRSGNTGG	TGYGGTGGTD	YGTAGGTGYG	SGTGYGINTG					
CB4	YYGTDТADTG	AGPRSGNTGG	TGYGGTGGTD	YGTAGGTGYG	SGTGYGINTG					
CucVang	YYGTNTADTG	TGPRSGTТGG	TGYGGTGGTD	YGTТGGTGYG	SGTGYGVNTG					
M103	YYGTDТADTG	AGSGSGNTGG	TGYGGTGGTD	YGTAGGTGYG	SGTGYGINTG					
MV1C	YYGTNTADTG	TGPRSGTТGG	TGYGGTGGTD	YGTТGGTGYG	SGTGYGVNTG					
V74	YYGTDТADTG	RGARSGNTGG	TGYGATGGTD	YGTAGGTGYG	SGTGYGINTG					
									
		210	220	230	240					
VMK	GAHTEAGYGK	EHRQHEQSHG	GQHEKKGILD	KIKEKLPGGH	SDK					
CB4	GAHTEAGYGK	EHRQHEQSHG	GQHEKKGILD	KIKEKLPGGH	SDK					
CucVang	GAHTEAGYRK	EHRQHDQSHG	DQNEKKGIMD	KIKEKLPGGH	SDK					
M103	GAHTEAGYGK	EHRQHEQSHG	GQHEKKGILD	KIKEKLPGGH	SDK					
MV1C	GAHTEAGYRK	EHRQHDQSHG	DQDEEKGIMD	TIKEKLPGGH	SRK					
V74	GAHTEAGYGK	EHRQYEPESHG	GQHEKKGILD	KIKEKLPGGH	SDK					

Hình 6. So sánh trình tự axit amin trong protein do gen dehydrin của hai giống đậu tương VMK và CB4 mã hóa với bốn giống đậu tương M103, Cúc Vàng, MV1C, V74

Kết quả so sánh ở hình 6 cho thấy, trình tự axit amin trong protein của hai giống đậu tương VMK và CB4 chỉ khác nhau ở một vị trí axit amin có thứ tự 87. Protein của hai giống VMK và CB4 khác với Cúc Vàng và MV1C ở 35 vị trí axit amin; giống VMK khác với M103 ở 3 vị trí axit amin, khác với V74 ở 2 vị trí axit amin; CB4 khác với M103 ở 2 vị trí axit amin, khác

với V74 ở 1 axit amin. Hai giống đậu tương VMK và CB4 có độ tương đồng cao so với M103 và V74 (97,5 - 99,2%), tiếp đến là với Cúc vàng và MV1C (81,4 - 81,9%). Về hệ số khác nhau, hai giống VMK và CB4 có hệ số sai khác với M103 và V74 là 0,8 - 2,5% và với Cúc Vàng và MV1C là 20,3 - 21,5% (bảng 4).

Hệ số tương đồng (ma trận tam giác trên) và hệ số khác nhau (ma trận tam giác dưới) về trình tự axit amin của protein dehydrin của 6 giống đậu tương

		Hệ số tương đồng về trình tự axit amin						
		VMK	CB4	CV	M103	MVIC	V74	
Hệ số khác nhau	VMK		100,0	81,9	99,2	81,4	97,5	VMK
	CB4	0,0		81,9	99,2	81,4	97,5	CB4
	CV	20,3	20,3		80,1	97,3	79,2	CV
	M103	0,8	0,8	21,5		80,5	97,1	M103
	MVIC	21,5	21,5	2,7	22,7		78,8	MVIC
	V74	2,5	2,5	22,7	3,0	23,9		V74
			VMK	CB4	CV	M103	MVIC	V74

III. KẾT LUẬN

1. Đánh giá khả năng chịu hạn của 9 giống đậu tương địa phương trên cả hai phương diện sinh lý và hoá sinh đã xác định được ba giống đậu tương CB4, VMK, HL có khả năng chịu hạn tốt nhất. Các giống VMK, CB4, HL có chỉ số chịu hạn cao nhất (10633,87; 7198,52; 6038,47), có hàm lượng prolin trong cây tăng mạnh nhất và đều tăng trên 200% (203,91; 208,28; 290,29).

2. Đã khuếch đại đoạn gen mã hoá protein dehydrin (LEA D-11) với kích thước 751 bp từ ADN hệ gen của 7 giống đậu tương địa phương và thực hiện thành công tách dòng, xác định trình tự gen mã hoá dehydrin từ hai giống đậu tương VMK và CB4 có khả năng chịu hạn tốt nhất.

3. Đã so sánh trình tự gen dehydrin của giống đậu tương VMK và CB4 với 34 trình tự gen trên ngân hàng dữ liệu gen quốc tế, đặc biệt so sánh với bốn giống đậu tương M103, Cúc Vàng, MVIC, V74 đã cho thấy trình tự gen dehydrin và trình tự axit amin trong protein của các giống đậu tương này có độ tương đồng khá cao. Trình tự gen dehydrin của hai giống đậu tương VMK và CB4 có độ tương đồng là 99,9%, trình tự axit amin trong protein của hai giống VMK và CB4 có độ tương đồng gần 100%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bates L. S., 1973: Plant Soil, 39: 205-207.
- Lê Trần Bình, Lê Thị Muội, 1998: Phân lập gen và chọn dòng chống chịu ngoại cảnh bất lợi của lúa. Nxb. Đại học quốc gia, Hà Nội.
- Bray E. A., 1997: Trendplant Sci, 2: 47-54.
- Close T. J., 1996: Physiol. Plant, 97: 795-803.
- Curtis J., Shearer G., Kohl D. H., 2004: Plant Physiol., 136(2): 3313-3318.
- Phạm Thị Trân Châu và cs., 1999: Thực hành Hóa sinh học. Nxb. Giáo dục, Hà Nội.
- Ngô Thế Dân và cs., 1999: Cây đậu tương. Nxb. Nông nghiệp.
- Foolad M. R. et al., 1995: Tissue ADN organ culture: 281-298. Fundamental methods. Springer verlag, Berlin, Heidelberg.
- Nguyễn Huy Hoàng, 1992: Nghiên cứu khả năng chịu hạn của các giống đậu tương nhập nội ở miền Bắc Việt Nam, Luận án phó tiến sỹ Sinh học, Hà Nội.
- Nguyễn Thu Hiền và cs., 2005: Báo cáo khoa học tại Hội nghị toàn quốc - Những vấn đề nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống: 1224-1227. Đại học Y Hà Nội. Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
- Cao Xuân Hiếu và cs., 2003: Tạp chí Công nghệ Sinh học, 1(2): 237-244.
- 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 sỹ Sinh học, Viện Công nghệ Sinh học, Hà Nội.
- Maitra N. and Cushman J. C., 1994: Plant Physiol., 106: 805-806.

14. **Chu Hoàng Mậu và cs.**, 2000: Tạp chí Khoa học và Công nghệ, 1(13): 16-21. Đại học Thái Nguyên.
15. **Chu Hoàng Mậu, Nguyễn Thuý Hương**, 2006: Tạp chí Nông nghiệp & Phát triển Nông thôn, 94(2): 22-26.
16. **Porcel R., Azcon R., Ruiz-Lozano J. M.**, 2005: J. Exp Bot., 56(417): 1933-1942.
17. **Soulages J. L. et al.**, 2003: Plant. Physiol., 131(3): 963-975.
18. **Http: //www.ncbi.nlm.nih.gov.**

ASSESSMENT OF DROUGHT TOLERANT ABILITY AND CLONING OF THE ENCODING DEHYDRIN PROTEIN (LEA-D11) GIENE OF SOME MOUNTAIN LOCAL SOYBEAN CULTIVARS [*GLYCINE MAX* (L.) MERRILL]

CHU HOANG MAU, NGUYEN THU HIEN

SUMMARY

Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] is a cultivar which has not only highly economic and nutritious value but also degraded earth- improved ability. The mountain local cultivars in the North of Vietnam are precious gene source because of preeminent quality and ability against the harm of environment.

In our work, the artificial method of making drought is used to estimate the drought tolerant ability of nine mountain local soybean cultivars by physiological and biochemical aspects. Its result shows that there are four most drought tolerant soybean cultivars, which are CB4, VMK, QH and HL. The CB4, VMK and HL have the highest drought tolerant index (corresponding to 10633.87, 7198.52 and 6038.47) and the strongest increase of 200% of proline content (corresponding to 203.91, 208.28, 246,90% and 290.29%).

A 751 bp dehydrin gene fragment from DNA of genome of seven local soybean cultivars was amplified by PCR with primers MD1, MD2 and carried out successfully the cloning of gene and determine the gene arrangement encoding dehydrin protein of VMK and CB4 which have the most drought tolerant ability.

The nucleotide sequence of dehydrin gene of VMK and CB4 was compared with that of other 34 gene in GenBank, especially compared with that of four soybean cultivars (M103, CucVang, MV1C and V74). This shows that the dehydrin gene sequence and the amino acid sequence of these soybean cultivars have quite high homology. The dehydrin gene sequence of the VMK and CB4 has the homology of 99.9%, the amino acid sequence of the VMK and CB4 has the homology of 100%.

Ngày nhận bài: 18-6-2007