

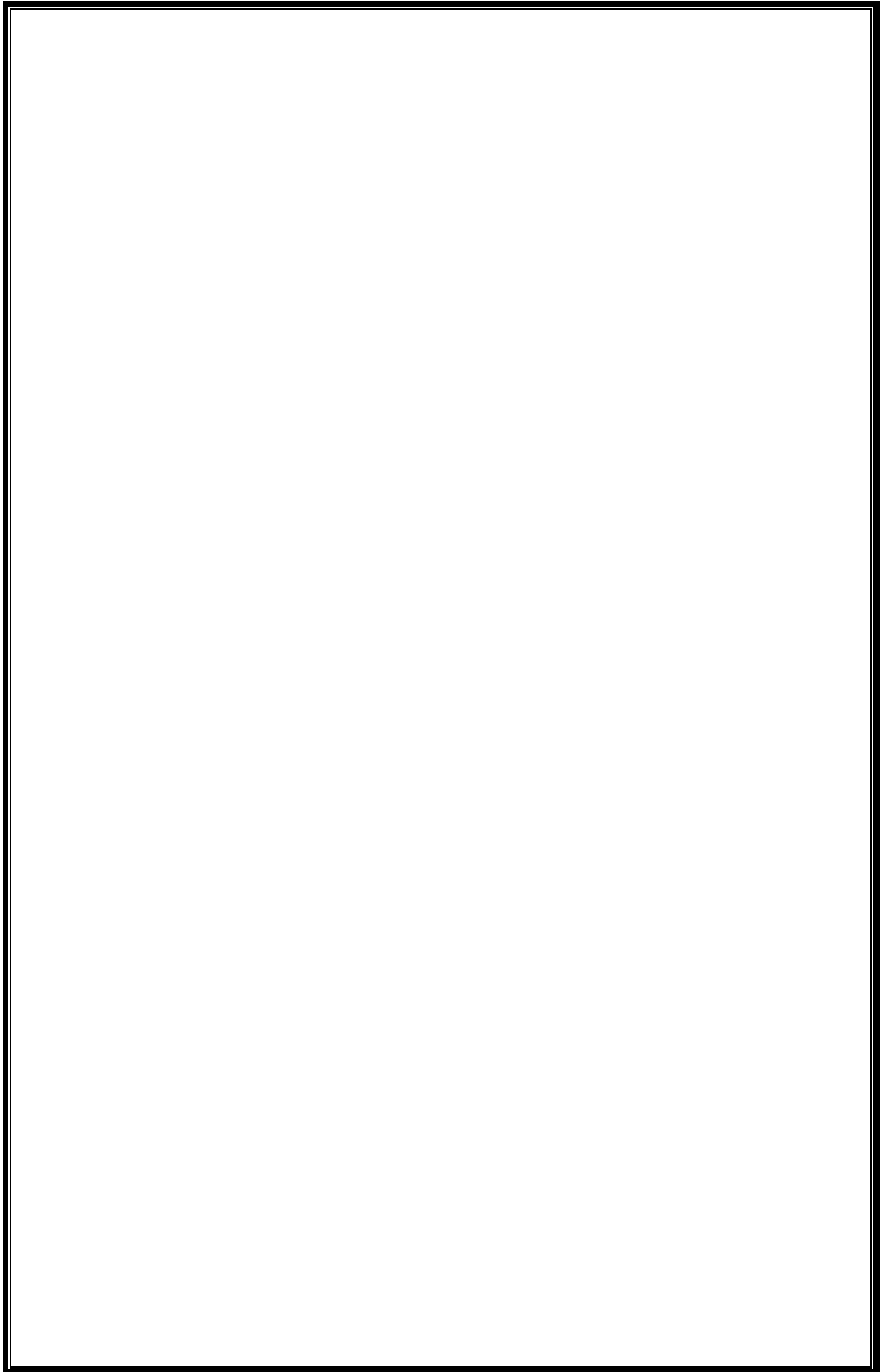
VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM  
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

**BÙI VĂN THẮNG**

**NGHIÊN CỨU TĂNG CƯỜNG KHẢ NĂNG CHỐNG CHỊU CÁC ĐIỀU KIỆN  
BẤT LỢI CỦA MÔI TRƯỜNG TRÊN ĐỐI TƯỢNG CÂY XOAN TA  
(*Melia azedarach* L.) BẰNG CÔNG NGHỆ GEN THỰC VẬT**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC**

**Hà Nội, 2014**



VIỆN HÀN LÂM KHOA HỌC VÀ CÔNG NGHỆ VIỆT NAM  
VIỆN CÔNG NGHỆ SINH HỌC

**BÙI VĂN THẮNG**

**NGHIÊN CỨU TĂNG CƯỜNG KHẢ NĂNG CHỐNG CHỊU CÁC ĐIỀU KIỆN  
BẤT LỢI CỦA MÔI TRƯỜNG TRÊN ĐỐI TƯỢNG CÂY XOAN TA  
(*Melia azedarach* L.) BẰNG CÔNG NGHỆ GEN THỰC VẬT**

**Chuyên ngành: Di truyền học**

**Mã số: 62 42 01 21**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC**

**Người hướng dẫn khoa học: 1. PGS.TS. Chu Hoàng Hà**

**2. TS. Lê Văn Sơn**

**Hà Nội, 2014**

## MỞ ĐẦU

### 1. Tính cấp thiết của đề tài

Biến đổi khí hậu ngày càng diễn ra mạnh mẽ là nguyên nhân làm tăng những bất lợi từ môi trường, ảnh hưởng đến sự sinh trưởng và phát triển của nhiều loài cây trồng. Do sự thay đổi khí quyển với hiệu ứng nhà kính, nhiệt độ của khí quyển ấm dần lên, băng tan ở hai cực sẽ tạo sự ngập lụt ở các vùng đất thấp. Lũ lụt, hạn hán và sự xâm nhập mặn sẽ trở thành vấn đề lớn gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến phát triển nông lâm nghiệp. Để thích ứng với những biến đổi khí hậu và những hệ quả của chúng, chiến lược chung của ngành nông lâm nghiệp là ưu tiên tạo ra những giống cây trồng chống chịu được khô hạn, mặn, ngập úng, lạnh và chống chịu với đất có vấn đề như acid, thiếu lân, ngộ độc sắt, ngộ độc nhôm.

Những tác động bất lợi từ môi trường như khô hạn, đất nhiễm mặn, ngập úng, nhiệt độ cực đoan thường làm mất cân bằng về áp suất thẩm thấu gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến năng suất và chất lượng của nhiều loài cây trồng (Linhui et al., 2012). Một trong những phản ứng thường gặp nhất khi cây gặp các điều kiện bất lợi về nước đó là tăng cường tổng hợp và tích lũy các chất chuyển hóa như các loại đường tan, axit amin, v.v. để tăng cường áp suất thẩm thấu cho tế bào. Proline và glycine betaine được biết đến là một trong những chất đóng vai trò quan trọng trong quá trình điều chỉnh áp suất thẩm thấu nội bào khi thực vật sống trong các điều kiện bất lợi như khô hạn, mặn, lạnh (Sávio et al., 2012). Trong tế bào thực vật, glycine betaine (GB) được tổng hợp từ choline thông qua hai phản ứng liên tiếp được xúc tác bởi choline monooxygenase (CMO) và betain aldehyde dehydrogenase (BADH) (Rathinaspathi et al., 1997). Cũng giống như thực vật bậc cao, ở vi khuẩn *E. coli* và ở một số động vật, con đường sinh tổng hợp GB cũng trải qua hai bước là khử choline thành betaine aldehyde và oxy hóa betaine aldehyde thành GB (Takabe et al., 1998). Ngược lại, con đường sinh tổng hợp GB ở vi khuẩn *Arthrobacter globiformis* và *Arthrobacter panescens* lại rất đơn giản, từ choline chuyển hóa thành sản phẩm trực tiếp là GB chỉ cần xúc tác bởi choline oxydase (COD) (Ikuta et al., 1977). Sinh tổng hợp proline ở thực vật bậc cao có thể được thực hiện qua hai con đường hoặc từ glutamate hoặc từ ornithine. Con đường sinh tổng hợp proline từ glutamate được chứng minh đầu tiên ở vi khuẩn bởi Leisinger (Leisinger, 1987) và sau đó là ở nhiều loài sinh vật nhân sơ và nhân chuẩn

khác nhau. Ở thực vật bậc cao, chu trình này chỉ được xác định sau khi các nhà khoa học thành công trong việc phân lập được đoạn cDNA của gen mã hóa cho enzyme pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) (Hu et al., 1992). P5CS là một enzyme giữ hai chức năng, thứ nhất enzyme hoạt hóa glutamate trở thành dạng hoạt động là glutamic semialdehyde và sau đó xúc tác cho phản ứng đóng vòng để tạo ra pyrroline-5-carboxylate. Dẫn xuất này sau đó sẽ bị khử bằng phản ứng xúc tác bởi enzyme pyrroline-5-carboxylate reductase để tạo proline.

Từ những hiểu biết sâu sắc về con đường sinh tổng hợp glycine betaine và proline ở sinh vật, cùng với sự phát triển mạnh mẽ của lĩnh vực công nghệ gen, đặc biệt là kỹ thuật tạo cây trồng biến đổi gen. Các nhà khoa học đã phân lập được các gen: *codA* (*COD*), *COX*, *BADH*, *betA* (*CDH*), *CMO*, *GSMT*, *SDMT*, *P5CS* và *P5CR* từ nhiều nguồn khác nhau, mã hóa cho các enzyme tham gia vào quá trình sinh tổng hợp GB và proline. Các gen này đã được thiết kế với các promoter biểu hiện đặc hiệu, mạnh và chuyển thành công vào nhiều loài cây trồng, các loài cây trồng biến đổi gen tăng cường khả năng chống chịu điều kiện bất lợi của môi trường (Amudha & Balasubramani, 2011). Các kết quả công bố cho thấy: Cây *Arabidopsis thaliana* chuyển gen *codA*, *COX*, *GSMT/SDMT* tăng cường khả năng chịu lạnh, nhiệt độ cao, chịu mặn và băng giá (Ali et al., 1998a, 1998b; Hayashi et al., 1997, 1998; Sakamoto et al., 2000; Huang et al., 2000), cây cải bẹ (*Brassica juncea*) chuyển gen *codA* có khả năng chịu mặn tốt hơn cây đối chứng (Waditee et al., 2005). Tương tự, cây lúa (*Oriza sativa*) chuyển gen *codA*, *betA*, *COX*, *CMO*, cây cà chua, cây hồng, cây bạch đàn chuyển gen *codA* cũng tăng cường khả năng chịu lạnh, hạn, mặn và oxy hóa (Sakamoto et al., 1998, Takabe et al., 1998; Su et al., 2006; Shirasawa et al., 2006; Mohanty et al., 2002; Park et al., 2004, 2007a; Yu et al., 2009). Cây thuốc lá chuyển gen *COX*, *betA*, *CMO*, *BADH* (Lilius et al., 1996; Nuccio et al., 1998; Yang et al., 2008), cây cà rốt chuyển gen *BADH* (Kumar et al., 2004); cây bông và ngô chuyển gen *betA* (Lv et al., 2007; Quan et al., 2004a, 2004b) cũng đã được chứng minh là chống chịu tốt hơn với các điều kiện cực đoan của môi trường. Kết quả nghiên cứu chuyển gen *P5CS*, *P5CR*,  $\sigma$ -*OAT* tham gia sinh tổng hợp proline vào cây thuốc lá, lúa nước, lúa mì, cà rốt, chanh, đậu tương, *Arabidopsis* cho thấy cây chuyển gen chống chịu tốt hơn với điều kiện môi trường sống bị mặn, hạn, oxy hóa, nhiệt cao và băng giá (Kavi Kishor et al., 1995; Zhu et al., 1998; Hong et al.,

2000; Anoop et al., 2003; Su & Wu, 2004; Sawahel & Hassan, 2002; Han & Hwang, 2003; Hur et al., 2004; Molinari et al., 2004; De Ronde et al., 2004).

Việt Nam là một trong những quốc gia bị tác động mạnh mẽ của việc biến đổi khí hậu, do đó hạn hán và đất nhiễm mặn hoang hóa đang ngày một gia tăng, đây sẽ là một trong những nguyên nhân chính làm giảm năng suất và chất lượng cây trồng nông lâm nghiệp và thu hẹp diện tích đất canh tác. Vì vậy, việc triển khai các nghiên cứu nhằm tạo ra được các giống cây trồng nông lâm nghiệp có khả năng chống chịu được các điều kiện bất lợi của môi trường nhưng vẫn đảm bảo được năng suất và chất lượng tốt đang là vấn đề cấp bách và cần thiết nhất hiện nay. Trên thế giới, các nghiên cứu tạo cây trồng biến đổi gen tăng cường chống chịu các điều kiện môi trường bất lợi chủ yếu tập chung vào nhóm cây nông nghiệp, còn nhóm cây lâm nghiệp (cây gỗ) mới chỉ có một vài công trình công bố (Yu et al., 2009, Yu et al., 2010). Trong lâm nghiệp, cây dương (*Populus* sp.) được sử dụng như là cây mô hình cho các nghiên cứu chuyển gen. Tuy nhiên, hạn chế duy nhất của loài cây này đó là khó sinh trưởng trong điều kiện khí hậu của Việt Nam. Vì vậy, việc tìm kiếm một loài cây dễ thích ứng và phổ biến ở Việt Nam để làm cây mô hình cho các nghiên cứu theo hướng quan tâm trên đối tượng cây lâm nghiệp trở nên rất cần thiết. Cây Xoan ta được đánh giá là một trong những cây trồng quan trọng trong chiến lược phát triển lâm nghiệp ở nước ta. Nó có mặt ở 6/9 vùng sinh thái lâm nghiệp, trong đó 3 vùng: Vùng Trung tâm, vùng Đồng bằng Sông Hồng và vùng Nam Trung bộ Xoan ta đứng đầu trong danh mục các cây trồng được ưu tiên phát triển theo quyết định số 16/2005/QĐ-BNN ngày 15/03/2005 của Bộ trưởng Bộ NN&PTNT. Hơn nữa, những kết quả nghiên cứu bước đầu trong việc xây dựng phương pháp chuyển gen ở đối tượng cây Xoan ta là rất có triển vọng (Bui Van Thang et al., 2007a; Nirsatmanto & Gyokusen, 2007; Ngo Van Thanh et al., 2010) cho phép các nhà khoa học có thể tiến hành các nghiên cứu cải thiện giống, đặc biệt là nâng cao tính chống chịu của loài cây này và có thể sử dụng như một loài cây mô hình cho các nghiên cứu chuyển gen vào cây lâm nghiệp ở Việt Nam. Xuất phát từ những lý do nêu trên, chúng tôi đã tiến hành thực hiện đề tài **“Nghiên cứu tăng cường khả năng chống chịu các điều kiện bất lợi của môi trường trên đối tượng cây Xoan ta (*Melia azedarach* L.) bằng công nghệ gen thực vật”**.

## 2. Mục tiêu nghiên cứu của đề tài

### 2.1. Mục tiêu chung:

Thông qua công nghệ chuyển gen để nghiên cứu khả năng tăng cường tính chống chịu các điều kiện môi trường bất lợi trên đối tượng cây Xoan ta nhằm bổ sung thêm cơ sở khoa học và thực tiễn cho việc tạo giống cây trồng lâm nghiệp có khả năng chống chịu tốt với điều kiện môi trường bất lợi.

### 2.2. Mục tiêu cụ thể:

- (1) Xây dựng được quy trình chuyển gen vào cây Xoan ta đạt hiệu suất cao để làm công cụ nghiên cứu;
- (2) Đánh giá được hoạt động của promoter *rd29A* cảm ứng hạn ở các dòng Xoan ta chuyển gen;
- (3) Đánh giá được khả năng chịu hạn của các dòng Xoan ta chuyển gen *P5CS* đột biến loại bỏ hiệu ứng phản hồi ngược (*P5CSm*);
- (4) Đánh giá được khả năng chịu hạn, mặn của các dòng thuốc lá và Xoan ta chuyển gen *codA*.

## 3. Nội dung nghiên cứu

- (1) Xây dựng và tối ưu hóa quy trình chuyển gen vào cây Xoan ta thông qua *Agrobacterium tumefaciens*;
- (2) Tạo các dòng Xoan ta chuyển gen mang cấu trúc gen *rd29A::gus intron* và đánh giá hoạt động của promoter *rd29A* điều khiển biểu hiện gen *gus* trong điều kiện bình thường và xử lý hạn nhân tạo;
- (3) Tạo các dòng Xoan ta chuyển gen mang cấu trúc gen *rd29A::P5CSm* và đánh giá kiểu hình, đặc tính sinh lý, sinh hóa của cây chuyển gen trong điều kiện xử lý hạn nhân tạo;

(4) Tạo các dòng thuốc lá và Xoan ta chuyển gen mang cấu trúc gen 35S::TP-codA/35S::codA và đánh giá kiểu hình, đặc tính sinh lý, sinh hóa của cây chuyển gen trong điều kiện xử lý hạn, mặn nhân tạo.

#### **4. Đóng góp mới của luận án**

Luận án là công trình đầu tiên ở Việt Nam cũng như trên thế giới xây dựng được quy trình chuyển gen vào cây Xoan ta đạt hiệu suất cao thông qua *Agrobacterium tumefaciens*. Luận án là công trình đầu tiên tạo được các dòng cây Xoan ta chuyển gen *P5CSm/codA* và chứng minh được khả năng tăng cường tính chịu hạn và chịu mặn ở các dòng cây chuyển gen. Luận án cũng là công trình đầu tiên sử dụng gen *codA* đã được thích ứng mã di truyền ở thực vật để chuyển vào cây thuốc lá và cây Xoan ta, kết quả cho thấy cây chuyển gen sinh tổng hợp và tích lũy hàm lượng glycine betaine cao hơn rất nhiều lần so với các công trình công bố trước đây. Luận án đã góp phần bổ sung thêm cơ sở lý luận và thực tiễn cho việc ứng dụng công nghệ chuyển gen trong tạo giống cây trồng nông lâm nghiệp nói chung và cây Xoan ta nói riêng chống chịu tốt với các điều kiện môi trường bất lợi.



## Chương 1

### TỔNG QUAN TÀI LIỆU

#### 1.1. TÁC ĐỘNG CỦA ĐIỀU KIỆN MÔI TRƯỜNG BẤT LỢI ĐẾN CÂY TRỒNG

Thực vật có đặc điểm về trạng thái sống đặc thù, đó là bám trụ vào đất tại một chỗ, không di chuyển từ nơi sống này đến nơi sống khác trong suốt quá trình phát triển. Do đó, khác với động vật, thực vật thường xuyên đối mặt trực tiếp với các điều kiện ngoại cảnh bất lợi, tác động lên quá trình sinh trưởng và phát triển. Những tác động bất lợi từ môi trường có thể gây ra những biến đổi sinh lý, hóa sinh và hình thái; từ đó ảnh hưởng đến năng suất và chất lượng cây trồng.

##### 1.1.1. Tác hại của hạn đến sinh trưởng và phát triển của cây trồng

Hạn hán là một nguyên nhân quan trọng làm giảm năng suất và chất lượng sản phẩm của cây trồng. Khi môi trường hạn hán cây bị stress mất nước dẫn đến nhiều hậu quả nghiêm trọng (Abdullah et al., 2011; Belkheiri & Mulas, 2013): (i) Gây nên hiện tượng co nguyên sinh và làm cho cây bị héo. Sự co nguyên sinh chất xảy ra khi tế bào bị stress nước làm cho nước trong tế bào thất thoát ra ngoài nên khối nguyên sinh chất của tế bào co lại, thể tích không bào bị thu hẹp. Khi cây sống trong môi trường thiếu nước kéo dài, tế bào mất nước dẫn đến các mô trở nên mềm yếu và sự héo xảy ra. Mô thực vật bị héo tạm thời nhưng cũng có thể vĩnh viễn nếu sự thiếu nước xảy ra nghiêm trọng và trong thời gian dài. (ii) Môi trường sống bị khô hạn cản trở sự vận chuyển nước trong mạch gỗ. Khi thiếu nước do khô hạn sự cung cấp nước cho rễ không đủ trong đêm để thủy hóa các mô đã bị thiếu nước ban ngày, dẫn đến các lông hút bị tổn thương lớp ngoài vùng vỏ bị phủ chất sáp (suberin) làm giảm áp suất rễ nên ảnh hưởng đến đẩy cột nước lên cao trong mạch gỗ. Đặc biệt khi thiếu nước sẽ hình thành nhiều bọt khí trong mạch gỗ dẫn đến phá vỡ tính liên tục của cột nước nên cột nước trong mạch gỗ không được đẩy lên liên tục. (iii) Hạn hán làm dày lớp cutin trên bề mặt lá làm giảm sự thoát hơi nước qua biểu bì. (iv) Sự thiếu nước làm giảm cường độ quang hợp. Khi hàm lượng nước

trong lá còn khoảng 40 -50% quang hợp của lá bị đình trệ. (v) Đặc biệt, hạn hán cản trở sự sinh trưởng của cây trồng. Thiếu nước ảnh hưởng đến các hoạt động sinh lý, nhất là quang hợp nên làm giảm sinh trưởng và năng suất cây trồng nghiêm trọng.

### **1.1.2. Tác hại của đất nhiễm mặn đến sinh trưởng và phát triển của cây trồng**

Đất mặn là loại đất chứa hàm lượng muối cao ( $>0,2\%$ ) có nhiều ion độc. Nếu hàm lượng muối trong đất cao, áp suất thẩm thấu của dung dịch đất rất cao, có thể đạt 200 - 300 atm. Do đất nhiễm mặn có áp suất thẩm thấu cao nên cây không thể hút được nước từ môi trường gây nên hiện tượng hạn sinh lý. Cây bình thường không thể sống trong môi trường có áp suất thẩm thấu trên 40 atm. Ngoài ra, trong đất nhiễm mặn còn chứa nhiều ion độc. Các ion này cạnh tranh với chất dinh dưỡng trong quá trình hút của rễ làm cho rễ khó hút chất dinh dưỡng dẫn đến cây trồng sinh trưởng chậm và giảm năng suất mạnh. Trong đất nhiễm mặn có các muối NaCl,  $\text{Na}_2\text{SO}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{MgCl}_2$ , v.v. các muối này có hàm lượng cao trong đất đều gây độc cho cây. Khi cây hút các ion độc vào trong tế bào sẽ gây ra rối loạn các quá trình trao đổi chất của tế bào. Các ion độc sẽ ức chế hoạt động của các enzyme, các chất điều hòa sinh trưởng dẫn đến làm rối loạn các quá trình trao đổi chất và các hoạt động sinh lý bình thường của tế bào. Các ion độc còn làm ảnh hưởng bất lợi đến nguyên sinh chất, làm giảm mạnh độ nhớt, tính thẩm của nguyên sinh chất làm cho tế bào mất chất dinh dưỡng. Các hoạt động sinh lý của tế bào cũng bị ảnh hưởng nghiêm trọng khi cây bị tác động của muối mặn. Quá trình quang hợp giảm mạnh do lá kém phát triển, sắc tố quang hợp ít do các chất độc ức chế quá trình tổng hợp các sắc tố quang hợp. Quá trình hô hấp tăng mạnh, các cơ chất bị phân hủy mạnh nhưng hiệu quả tạo năng lượng thấp do phần lớn năng lượng của các quá trình dị hóa bị thải ra dưới dạng nhiệt làm cho tế bào thiếu năng lượng ATP để duy trì các hoạt động bình thường. Phân hủy mạnh, tổng hợp lại yếu nên không bù đủ lượng vật chất do hô hấp phân hủy, dẫn đến các chất dự trữ bị hao hụt mạnh, do đó cây không sinh trưởng hoặc sinh trưởng chậm, còi cọc và năng suất