

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN

NGUYỄN THỊ THU NGÀ

**NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP VÀ CHUYỂN GEN
NAC2LIÊN QUAN ĐẾN CHỊU HẠN Ở CÂY LẠC
(*Arachis hypogaea* L.)**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

THÁI NGUYÊN - 2014

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN

NGUYỄN THỊ THU NGÀ

**NGHIÊN CỨU PHÂN LẬP VÀ CHUYỂN GEN *NAC2*
LIÊN QUAN ĐẾN CHỊU HẠN Ở CÂY LẠC
(*Arachis hypogaea* L.)**

Chuyên ngành: Di truyền học
Mã số: 62 42 01 21

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học: GS.TS. LÊ TRẦN BÌNH

THÁI NGUYÊN - 2014

MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Một trong những hiện tượng thay đổi của môi trường ảnh hưởng tới sự sinh trưởng và phát triển của thực vật là tình trạng hạn. Hạn hán có ảnh hưởng xấu ở các mức độ khác nhau trong suốt quá trình hay từng giai đoạn sống của cơ thể thực vật dẫn đến làm giảm năng suất cây trồng, chậm phát triển và gây chết. Hiện nay trên thế giới có khoảng 45% diện tích đất trồng bị hạn hán. Tại Việt Nam, trong 7,3 – 7,4 triệu ha đất trồng thì có tới 1,5 – 1,8 triệu ha bị thiếu nước.

Nghiên cứu bản chất tính chống chịu của cây trồng cho thấy đây là một tính trạng đa gen. Vai trò cụ thể của từng gen riêng rẽ liên quan đến tính chống chịu ở thực vật (ví dụ *P5CS*, *RD22*...) đã được nhiều nghiên cứu tìm hiểu và phân tích. Tuy nhiên, dưới tác động của các yếu tố bất lợi từ ngoại cảnh, không chỉ các gen riêng rẽ được biểu hiện mà là một hệ thống các gen liên quan được kích hoạt biểu hiện nhằm đáp ứng với tình trạng bất lợi mà thực vật gặp phải. Một trong số những yếu tố kích hoạt hoạt động của các gen liên quan đến khả năng chống chịu là các nhân tố phiên mã (transcription factor – TF).

Nhân tố phiên mã NAC (NAC transcription factor) là một trong những họ TF đặc trưng lớn nhất trong hệ gen thực vật [106]. Nhân tố phiên mã NAC có liên quan đến nhiều quá trình sinh lý quan trọng trong cơ thể thực vật [99]. Nhiều gen NAC tham gia vào phản ứng với những áp lực khác nhau từ môi trường, trong đó có hạn [87], [113], [133]... Nhiều tác giả đã nghiên cứu chuyển gen mã hóa nhân tố phiên mã NAC thành công vào một số loài cây trồng như: cây lúa, lúa mì, thuốc lá,... [54], [55], [60], [77], [87], [103], [127], [133]. Trên đối tượng cây lạc, các gen *AhNAC1*, *AhNAC2*, *AhNAC3* liên quan đến tính chịu hạn đã được tách dòng thành công [71], *AhNAC2* đã được sử dụng để thiết kế vector mang cấu trúc gen chịu hạn và chuyển thành công vào cây *Arabidopsis* [72].

Lạc là cây nông nghiệp ngắn ngày được trồng phổ biến trên thế giới. Ở nước ta, cây lạc được trồng trên khắp các miền và phù hợp với nhiều vùng sinh thái khác nhau. Tuy nhiên, hạn, mặn, lạnh vẫn là yếu tố hạn chế đối với sự sinh trưởng và

năng suất của cây trồng trong đó có cây lạc. Cây lạc là cây họ đậu, thuộc nhóm chịu hạn kém [13]. Một số kỹ thuật chọn tạo giống có khả năng chịu hạn như lai giống hoặc ứng dụng công nghệ tế bào thực vật đã được áp dụng [11], [13], [14], [15]. Tuy nhiên, việc sử dụng kỹ thuật chuyển gen nhằm tạo ra những giống lạc có khả năng chịu hạn còn chưa được nghiên cứu nhiều. Từ những lí do trên, chúng tôi đã tiến hành đề tài: “*Nghiên cứu phân lập và chuyển gen NAC2 liên quan đến tính chịu hạn ở cây lạc (Arachis hypogaea L.)*” nhằm thử nghiệm khả năng chuyển gen chỉ thị và tiến tới chuyển gen chịu hạn với mục đích tạo ra dòng cây chuyển gen phục vụ chọn giống chịu hạn ở cây lạc. Ứng dụng thực tiễn của nghiên cứu nhằm cải tạo cây lạc và cải thiện về khả năng chống chịu trên đối tượng cây trồng này.

2. Mục tiêu nghiên cứu

- (1) Phân lập được gen mã hóa nhân tố phiên mã *NAC2* từ giống lạc chịu hạn tốt.
- (2) Thiết kế được vector chứa cấu trúc mang gen mã hóa nhân tố phiên mã *NAC2*. Tạo cây chuyển gen và biểu hiện được protein *NAC2* ở cây thuốc lá.
- (3) Tạo được dòng cây lạc chuyển gen. Phân tích các dòng cây lạc chuyển gen.

3. Nội dung nghiên cứu

- (1) Phân nhóm các giống lạc nghiên cứu theo mức độ chịu hạn thông qua đánh giá khả năng chịu hạn ở giai đoạn mô sẹo và cây non.
- (2) Phân lập, tách dòng và giải trình tự gen mã hóa nhân tố phiên mã *NAC2* liên quan đến tính chịu hạn của cây lạc.
- (3) Thiết kế vector chứa cấu trúc mang gen mã hóa nhân tố phiên mã *NAC2*, tạo vi khuẩn *A. tumefaciens* mang vectơ tái tổ hợp và chuyển vào cây thuốc lá mô hình.
- (4) Xác định sự có mặt của gen chuyển *NAC2* trên cây thuốc lá, đánh giá khả năng chịu hạn của các dòng thuốc lá chuyển gen thông qua sự thay đổi hàm lượng proline. Phân tích biểu hiện protein tái tổ hợp *NAC2* ở cây thuốc lá chuyển gen.
- (5) Phát triển hệ thống tái sinh cây ở cây lạc và chuyển gen chỉ thị (*GUS*) qua mô sẹo và phôi soma.
- (6) Chuyển cấu trúc mang gen mã hóa nhân tố phiên mã *NAC2* vào cây lạc, phân tích các dòng lạc chuyển gen.

4. Những đóng góp mới của luận án

i) Tách dòng thành công gen mã hóa nhân tố phiên mã NAC2 từ giống lạc chịu hạn tốt L12.

ii) Thiết kế thành công vector chứa cấu trúc mang gen mã hóa nhân tố phiên mã *NAC2* và chuyển vào cây thuốc lá, kết quả biểu hiện protein ở cây chuyển gen chứng minh cấu trúc đã thiết kế hoạt động tốt ở thuốc lá.

iii) Thông qua hệ thống tái sinh đã xây dựng, luận án tối ưu và hoàn thiện được quy trình chuyển gen hoàn chỉnh thông qua mô sẹo và phôi soma ở cây lạc nhằm phục vụ tạo cây lạc chuyển gen theo mục đích cải thiện khả năng chống chịu với tình trạng thiếu nước từ môi trường. Giống lạc LVT được thử nghiệm chuyển gen *GUS* và chuyển cấu trúc mang gen mã hóa nhân tố phiên mã *NAC2*.

5. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn

5.1. Ý nghĩa khoa học

i) Kết quả nghiên cứu của luận án cung cấp dẫn liệu khoa học về ứng dụng kỹ thuật chuyển gen nhằm phục vụ việc cải thiện tính chịu hạn của cây lạc.

ii) Cung cấp thông tin về nhân tố phiên mã NAC và gen *NAC2* ở cây lạc. Khả năng chịu hạn ở các giống lạc nghiên cứu và vai trò của gen *NAC2* trong đáp ứng với sự thiếu nước từ môi trường.

5.2. Ý nghĩa thực tiễn

Kết quả đánh giá khả năng chịu hạn của cây lạc ở mức độ mô sẹo và cây non được sử dụng làm cơ sở để đánh giá và ứng dụng biện pháp cải thiện khả năng chịu hạn của cây lạc. Kết quả thu được ban đầu về cây lạc chuyển gen sẽ làm căn cứ để đánh giá ở các mức độ tiếp theo nhằm phục vụ các nghiên cứu về cải thiện tính chịu hạn của cây lạc.

Chương 1

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. HẠN VÀ TÁC ĐỘNG CỦA HẠN ĐẾN THỰC VẬT

1.1.1. Tác động của hạn đến thực vật và cây lạc

1.1.1.1. Cây lạc

Cây lạc có nguồn gốc ở vùng Nam Bolivia, Tây bắc Argentina, Nam Mỹ. Người Bồ Đào Nha đưa cây lạc từ Brazil sang Tây Phi và sau đó đến Tây Nam Ấn Độ từ thế kỉ XVI. Sau đó được đem trồng ở rất nhiều nước trên thế giới. Ở Việt Nam, cây lạc được du nhập từ Trung Quốc sang và được trồng vào khoảng thế kỉ XVII- XVIII [8], [13].

Về mặt phân loại, cây lạc có tên khoa học là *Arachis hypogaea* (L.) với $2n=40$ NST. Theo Krapo Vikas và một số tác giả khác, cây lạc thuộc họ cánh bướm *Fabaceae*, thuộc chi *Arachis*. Loài lạc trồng *Arachis hypogaea* (L.) gồm hai loài phụ: Loài phụ *Hypogaea* gồm hai chủng: *Hypogaea* loại hình *Virginia* và *Bersuta kohter*. Loài phụ *Fastigiata* gồm hai chủng: *Fastigiata* loại hình *Valencia* và *Vulgaris harz* loại hình *Spanish*.

Về hình thái, cây lạc gồm các bộ phận chính là rễ, thân, lá, hoa và quả lạc.

Rễ lạc có rễ cọc và rễ con. Trên rễ lạc có nhiều nốt sần được tạo thành do vi khuẩn *Rhizobium* sống cộng sinh, do vậy cây lạc có khả năng cố định nitơ phân tử trong không khí thành đạm cung cấp cho cây và đất trồng. Những nốt sần này tăng nhanh về số lượng và kích thước từ khi cây lạc có 6 - 7 lá đến lúc nở hoa. Thân chính của cây lạc thường chỉ cao khoảng 25cm - 50cm. Lá lạc là loại lá kép hình lông chim có 4 lá chét mọc đối nhau, hình trái xoan ngược, có 2 lá kèm hình dải nhọn bao quanh thân. Trên thân chính thường có khoảng 20 lá. Khi cây lạc có 5 - 6 lá trên thân chính thì lạc bắt đầu phân hoá các mầm hoa. Hoa lạc mọc ra từ các mắt của cành. Mỗi vị trí có thể có từ 3 - 5 hoa, khi cây lạc đã có 8 - 9 lá thì hoa nở. Lạc là loại cây tự thụ phấn nghiêm ngặt, khi thấy hoa nở là cây đã thụ phấn xong. Hoa lạc sau khi thụ phấn thì đâm tua xuống đất hình thành quả (thường gọi là củ). Quả

lạc có hình trụ thuôn thắt lại ở giữa các hạt, vỏ quả cứng có gân mạng. Mỗi quả có 1 - 3 hạt. Hạt hình trứng, có vỏ lụa màu đỏ, vàng, cánh sen hoặc trắng [13].

Theo thời gian sinh trưởng của cây lạc, người ta chia làm giống chín sớm (thời gian sinh trưởng 90 ngày - 125 ngày) và giống chín muộn (140 ngày - 160 ngày). Cây lạc đòi hỏi khí hậu nóng ẩm, nhiệt độ cho sinh trưởng phát triển của cây lạc từ 24°C - 33°C. Nhiệt độ để hạt nảy mầm thấp nhất phải trên 12°C, từ 15°C hạt lạc đã bắt đầu nảy mầm tốt, dưới 17°C hoa không thụ phấn, yêu cầu độ ẩm từ 60% - 70%, độ ẩm thấp dưới 60% đã kéo dài thời gian nảy mầm và hạt không nảy mầm được ở độ ẩm đất 40% - 50%. Đất trồng lạc lí tưởng phải là đất thoát nước nhanh, chân đất nhẹ, thoáng, có màu sáng, tơi xốp, phù sa pha cát có đầy đủ canxi và lượng chất hữu cơ vừa phải sẽ tạo điều kiện cho lạc nảy mầm, dễ dàng ngoi lên mặt đất và sinh trưởng, hình thành quả tốt, độ pH của đất từ 6-7 là thích hợp nhất [13].

Cây lạc được coi là cây trồng có hiệu quả kinh tế cao và có giá trị đa dạng về các mặt dinh dưỡng, chăn nuôi, trồng trọt và trong công nghiệp.

Diện tích trồng lạc tập trung nhiều nhất ở vùng Thanh Hoá, Nghệ An, Hà Tĩnh rồi tới đồng bằng và trung du Bắc Bộ (Bắc Giang, Bắc Ninh, Hà Nam, Nam Định, Ninh Bình). Trên thực tế, diện tích trồng lạc ở nước ta còn nhỏ và phân tán, trừ một vài vùng lạc tập trung như Diễn Châu (Nghệ An), Hậu Lộc (Thanh Hoá). Gần đây cây lạc được khuyến khích phát triển mạnh, đặc biệt ở những nơi đất bạc màu, thoái hoá như vùng trung du và đồng bằng Bắc Bộ, những dải đất ven biển từ Thanh Hoá chạy dài tới giáp Đông Nam Bộ,... đều có thể trồng được lạc. Nhiều vùng đất, nhất là ở miền Nam có thể trồng được 2 vụ lạc trong năm [13].

1.1.1.2. Tác động của hạn đến thực vật

Hạn là một trong những yếu tố cực đoan phi sinh học được quan tâm đến nhiều nhất hiện nay. Hiện tượng khô hạn xảy ra khi trong môi trường đất và không khí thiếu nước đến mức áp suất thẩm thấu của cây không cạnh tranh được để lấy nước vào tế bào. Trong trường hợp này, tác động của môi trường bên ngoài rất lớn, gây ảnh hưởng đáng kể lên sự phát triển của thực vật, có thể dẫn đến hủy hoại cây cối và mất mùa [7], [23], [27], [36]. Các yếu tố bất lợi của môi trường có thể là: nhiệt độ cao, gió nóng, thời tiết và khí hậu. Khái niệm hạn dùng để chỉ tình trạng

mất nước của cây. Khả năng thực vật có thể giảm thiểu mức tổn thương do thiếu hụt nước gây ra gọi là tính chịu hạn [7].

Xu thế thay đổi của khí hậu làm cho hạn hán bất thường xảy ra ở nhiều nơi, đây là nguyên nhân chính làm giảm năng suất cây trồng [94]. Theo FAO, ước tính có 70% tiềm năng về năng suất bị mất đi do điều kiện bất lợi của môi trường và sâu bệnh hại, ngay cả ở những quốc gia có nền nông nghiệp phát triển. Hiện nay trên thế giới có khoảng 45% diện tích đất trồng bị hạn hán [45]. Tại Việt Nam, trong 7,3-7,5 triệu ha đất trồng thì có tới 1,5-1,8 triệu ha thiếu nước.

Khi gặp hạn, trạng thái của chất nguyên sinh trong tế bào thay đổi mạnh, ảnh hưởng đến tính chất hoá lý của chất nguyên sinh như tính thẩm, mức độ thủy hoá của keo, thay đổi pH, độ nhớt, cuối cùng ảnh hưởng đến quá trình trao đổi chất bình thường của cơ thể. Hạn ảnh hưởng xấu đến quá trình hình thành diệp lục, phá hoại lục lạp nên hiệu suất quang hợp giảm xuống nhanh chóng. Hạn ảnh hưởng đến hoạt động hút khoáng của bộ rễ, dẫn đến tình trạng thiếu những nguyên tố dinh dưỡng quan trọng trong quá trình trao đổi và tổng hợp các chất hữu cơ khác nhau trong cơ thể thực vật [28], [36], [45].

Để chống khô hạn, cây có thể giữ không bị mất nước, giảm diện tích lá, rút ngắn chu kỳ sống. Bất kỳ sự mất nước nào cũng dẫn đến hiện tượng thiếu hụt nước trong tế bào. Nước vừa là nguyên liệu, vừa là môi trường để các phản ứng trao đổi chất xảy ra. Vì vậy, sự vi phạm chế độ nước ảnh hưởng rất lớn đến mọi quá trình sinh trưởng và phát triển của cây.

Về tác động của hạn đến thực vật, các nhà khoa học tập trung nghiên cứu theo 2 hướng: khảo sát tính chịu hạn của các đối tượng thực vật trong điều kiện tự nhiên ngoài đồng ruộng hoặc trong điều kiện nhân tạo tại phòng thí nghiệm.

Nhiều cây trồng như ngô, lúa, đậu tương, lạc... đã được các nhà nghiên cứu đánh giá, khảo sát về đặc tính chịu hạn thông qua các điều kiện tự nhiên ngoài đồng ruộng. Một trong những phương pháp được sử dụng là chủ động gây ra sự thiếu nước và tiến hành nghiên cứu phản ứng của các cơ thể thực vật trong điều kiện này. [5]. Khi gặp hạn, cây lạc cũng chịu ảnh hưởng nặng nề đến quá trình sinh trưởng và phát triển. Khi tiến hành nghiên cứu ngoài tự nhiên bằng phương pháp gây hạn nhân

tạo, nhận thấy sự thiếu hụt nước ở thời kì ra nụ hoa đã làm giảm diện tích lá, làm giảm sút cường độ quang hợp của lá, giảm khả năng đậu quả và khối lượng quả chắc, giảm hàm lượng lipid trong hạt lạc [8]. Những quan sát cho thấy, trong điều kiện thí nghiệm gây thiếu nước ở thời kì ra hoa đã làm giảm nghiêm trọng số hoa, đọt ra hoa hoặc hoa nở rộ không hình thành được, thời gian ra hoa kéo dài, tỉ lệ hoa có ích giảm đi do quá trình thụ phấn bị cản trở [13].

Trong điều kiện nhân tạo, nhiều nghiên cứu tiến hành đánh giá tác động của hạn ở một số giai đoạn phát triển của các đối tượng thực vật khác nhau như mô sẹ, hạt nảy mầm, cây non 3 lá... Trên thế giới và Việt Nam đã có nhiều nghiên cứu nhằm đánh giá tác động của hạn và nâng cao tính chịu hạn ở cây trồng ở mức độ *in vitro* như ngô [42], lạc [11], [14], lúa [2], khoai tây [67],...

Nhiều nghiên cứu đã sử dụng PEG, sorbitol, manitol... như những tác nhân gây khô hạn trong môi trường nuôi cấy nhằm nghiên cứu tác động của hạn lên thực vật. PEG là một hợp chất có ái lực rất lớn với nước, khi đưa vào môi trường nuôi cấy, nó không chỉ ngăn cản rễ hút nước mà còn chiếm nước từ rễ cây, khiến cây nhanh chóng rơi vào tình trạng sốc hạn [67].

Như vậy có thể thấy, mức độ ảnh hưởng của các yếu tố cực đoan, trong đó có hạn đến khả năng phản ứng của cây trồng là rất rõ rệt. Hiện tượng mất nước cục bộ chỉ gây thiệt hại cho một nhóm nhỏ, nhưng hạn hán kéo dài sẽ gây thiệt hại cho nhiều loại cây trồng, ảnh hưởng đến năng suất và chất lượng. Các loài thực vật khác nhau sẽ có khả năng chống chịu khác nhau với các yếu tố cực đoan phụ thuộc vào bản chất di truyền từ bao thế hệ của chúng. Vì vậy, có cây có thể chống chịu được và tồn tại, có cây sẽ bị chết. Ngay trong cùng một loài, các cá thể khác nhau cũng phản ứng ở các mức độ không hoàn toàn như nhau [7].

1.1.1.3. Tác động của hạn đến cây lạc

Cây lạc được trồng trên 35,5 triệu ha ở 82 quốc gia trên thế giới. Hơn một nửa số khu vực sản xuất, chiếm 70% diện tích trồng lạc thuộc vùng khô hạn và bán khô hạn; ở những nơi này, cây lạc thường xuyên chịu áp lực hạn hán với thời gian và cường độ khác nhau [50], [79], [92], [104]. Dự kiến giá trị tổn thất hàng năm trong sản xuất lạc tương đương với hơn 520 triệu USD gây ra bởi hạn [39], [40]. Tại Hoa Kỳ, cây lạc

đóng góp 4 tỷ USD cho nền kinh tế của đất nước mỗi năm. Tại đây, phần lớn cây lạc được trồng dưới điều kiện nước trời và chỉ có một diện tích hạn chế được tưới tiêu [39]. Ở châu Á và châu Phi, cây lạc được trồng trong điều kiện nước trời trong mùa mưa và bị hạn hán liên tục do lượng mưa ít có thể xảy ra bất kỳ thời điểm nào trong chu kỳ sống của cây trồng [40]. Ở Việt Nam, sản xuất lạc được phân bố ở tất cả các vùng sinh thái nông nghiệp, với khoảng 40% tổng diện tích các cây công nghiệp ngắn ngày [13].

Ảnh hưởng của hạn với cây lạc được thể hiện theo nhiều cách, ảnh hưởng đến cả số lượng và chất lượng của cây trồng. Thâm hụt nước, tùy thuộc vào thời gian xảy ra, có thể là nguyên nhân gây ra hiện tượng giảm đáng kể năng suất lạc bằng cách tác động lên các quá trình sinh lý như cố định đạm, quang hợp, và sự hấp thu canxi cho phát triển vỏ quả [50], [79]. Khi cây lạc gặp hạn sẽ làm mất độ ẩm từ quả dẫn đến làm giảm hoạt động sinh lý của hạt, bên cạnh đó ảnh hưởng của hạn hán còn làm thay đổi chất lượng dinh dưỡng của protein trong hạt lạc [39]. Hạn làm ảnh hưởng đến lipid màng tế bào, các phản ứng quang hợp [92], quá trình trao đổi chất, tăng trưởng và năng suất của cây lạc [39]. Thiếu hụt về độ ẩm làm cản trở quá trình hình thành nốt sần ở các cây họ đậu. Có nhiều bằng chứng cho thấy, quá trình hấp thụ N, P và K của cây lạc bị giảm do hạn hán [39].

Hạn đã ảnh hưởng xấu đến các mối quan hệ về nước, quang hợp, dinh dưỡng khoáng, sự trao đổi chất và tăng trưởng ở lạc. Hạn hán căng thẳng nghiêm trọng làm giảm hàm lượng chất diệp lục a, b và diệp lục tổng số. Sự sụt giảm chất diệp lục là do sự ức chế tổng hợp chất diệp lục. Tích lũy hàm lượng chất khô bị giảm khi tình trạng thiếu nước kéo dài [39], [40], [92]. Căng thẳng về nước thường xuyên dẫn đến thay đổi về giải phẫu học như giảm kích thước của các tế bào và các khoảng gian bào, vách tế bào dày hơn và phát triển hơn của mô biểu bì, giảm kích thước lá và thay đổi trong hệ rễ [40], [92].

Sự thoát ra của các chất hòa tan là kết quả của hiện tượng tổn thương màng tế bào. Đây là một phản ứng thông thường của mô cây lạc dưới ảnh hưởng của một số điều kiện bất lợi từ môi trường như nhiệt độ thấp hoặc cao, độ ẩm của đất thấp hoặc độ mặn của đất cao. Nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng, canxi là yếu tố cần thiết để duy