

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

ĐÀO XUÂN TÂN

**NGHIÊN CỨU ĐẶC ĐIỂM VÀ CHUYỂN GEN *GmDREB2*  
NHẪM CẢI THIỆN TÍNH CHỊU HẠN CỦA  
CÂY ĐẬU TƯƠNG (*Glycine max* (L.) Merrill)**

**LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC**

**THÁI NGUYÊN - 2017**

## MỞ ĐẦU

### 1. Đặt vấn đề

Đậu tương (*Glycine max* (L.) Merrill) là một trong những cây trồng quan trọng hàng đầu ở nhiều quốc gia trên thế giới, trong đó có Việt Nam. Việc tiêu thụ đậu tương và các sản phẩm từ đậu tương đang gia tăng trên toàn thế giới do những tác dụng có lợi tới sức khỏe của con người như: Phòng chống ung thư, ngăn ngừa bệnh tiểu đường và béo phì, hạ cholesterol và bảo vệ rối loạn thận. Hạt đậu tương là nguồn cung cấp dồi dào protein (32%-52%), lipid (12%-25%), vitamin (B1, B2, C, D, E...), nhiều amino acid thiết yếu (lysine, tryptophan, methionine, cysteine và leucine), chất xơ, năng lượng và các chất chuyển hóa thứ cấp. Vì vậy, hạt đậu tương được sử dụng làm thực phẩm cho con người, thức ăn cho gia súc, là nguồn nguyên liệu cho công nghiệp chế biến, mặt hàng xuất khẩu có giá trị kinh tế cao. Không chỉ có giá trị kinh tế và dinh dưỡng cao, cây đậu tương còn giữ vai trò quan trọng trong việc cải thiện độ phì và sử dụng bền vững tài nguyên đất canh tác. Gần đây, một trong những ứng dụng được quan tâm nhiều nhất của cây đậu tương là sản xuất dầu diesel sinh học.

Đậu tương được xem là cây trồng nhạy cảm với hạn. Hạn là yếu tố phi sinh học gây ảnh hưởng nghiêm trọng nhất và có thể làm giảm năng suất cây đậu tương khoảng 40%. Hạn ảnh hưởng đến tất cả các thời kỳ sinh trưởng và phát triển của cây đậu tương, trong đó thời kỳ ra hoa và thời kỳ sau ra hoa đã được chứng minh là những thời kỳ bị ảnh hưởng nghiêm trọng nhất. Hiện nay, do những biến đổi về khí hậu, đặc biệt là hạn kéo dài, lượng mưa không đều ở các thời điểm trong năm và giữa các vùng miền gây khó khăn cho sản xuất nông nghiệp ở nhiều quốc gia, tại Việt Nam cũng không tránh khỏi những tác động tiêu cực đó. Hơn nữa, Việt Nam có khoảng 75% diện tích là đồi núi, đất dốc, khả năng giữ nước kém nên việc canh tác các cây trồng nói chung và cây đậu tương nói riêng gặp rất nhiều khó khăn. Do đó, việc chọn tạo giống đậu tương có khả

năng chịu hạn tốt là vấn đề cấp thiết, mang tính thời sự ở Việt Nam cũng như trên thế giới.

Tính chịu hạn của cây đậu tương do nhiều gen quy định, sản phẩm của các gen này liên quan trực tiếp đến sự biểu hiện khả năng chịu hạn hoặc có chức năng điều hòa nhóm gen chịu hạn. Một số gen của đậu tương đã được mô tả là có phản ứng với tác động của hạn ở mức phiên mã. Trình tự *cis* và nhân tố *trans* giữ vai trò quan trọng trong sự biểu hiện gen đáp ứng tác động của hạn. Các protein DREB - Những nhân tố có tác động *trans* liên kết với các trình tự *cis* để kích hoạt sự biểu hiện của các gen mục tiêu khi có tín hiệu stress ở thực vật.

Việc cải thiện đặc tính di truyền của cây đậu tương để thích nghi với hạn được các nhà khoa học tiếp cận theo nhiều hướng: Lai hữu tính, gây đột biến thực nghiệm, chọn lọc quần thể, công nghệ tế bào, công nghệ gen. Trong đó, công nghệ gen được xem là biện pháp đem lại hiệu quả cao. Gần đây, đã có những tiến bộ trong việc cải thiện tính chịu hạn của cây đậu tương thông qua các kỹ thuật tác động vào nhân tố phiên mã hoặc yếu tố tín hiệu ở cây trồng chuyển gen. Tuy nhiên ở nước ta, một số nghiên cứu mới chỉ dừng lại ở việc chuyển các gen chức năng liên quan trực tiếp đến tính chịu hạn vào cây đậu tương, ít thấy công bố kết quả hoàn chỉnh về chuyển gen mã hóa protein là nhân tố kích hoạt quá trình phiên mã, trong đó có gen *GmDREB2*. Do đó, việc nghiên cứu đặc tính phân tử, xác định chức năng gen mã hóa nhân tố phiên mã liên quan tới tính chịu hạn, cũng như việc chuyển các gen này từ các giống đậu tương có khả năng chịu hạn tốt sang giống có khả năng chịu hạn kém đang trở thành hướng nghiên cứu triển vọng, nhận được sự quan tâm đặc biệt của các nhà khoa học ở trong và ngoài nước.

Xuất phát từ những lý do trên, chúng tôi đã tiến hành đề tài luận án: **"Nghiên cứu đặc điểm và chuyển gen *GmDREB2* nhằm cải thiện tính chịu hạn của cây đậu tương (*Glycine max* (L.) Merrill)".**

## **2. Mục tiêu nghiên cứu**

2.1. Phân tích được đặc điểm của gen *GmDREB2* phân lập từ các giống đậu tương Việt Nam có khả năng chịu hạn khác nhau.

2.2. Biểu hiện được protein tái tổ hợp và chức năng sinh học của gen chuyển *GmDREB2* trên cây thuốc lá chuyển gen.

2.3. Tạo cây đậu tương chuyển gen và biểu hiện được protein tái tổ hợp *GmDREB2* trên cây đậu tương chuyển gen.

## **3. Nội dung nghiên cứu**

3.1. Nghiên cứu thông tin, tách dòng và xác định trình tự gen *GmDREB2* phân lập từ cây đậu tương. Phân tích tính đa dạng trong trình tự nucleotide và protein của gen *GmDREB2* ở cây đậu tương.

3.2. Nghiên cứu thiết kế vector chuyển gen thực vật chứa cấu trúc mang gen *GmDREB2*.

3.3. Nghiên cứu chuyển gen và phân tích biểu hiện gen *GmDREB2* trên cây thuốc lá: (i) Tạo cây thuốc lá chuyển gen mang cấu trúc gen *GmDREB2*. (ii) Phân tích sự biểu hiện của protein tái tổ hợp *GmDREB2* trong cây thuốc lá. (iii) Đánh giá khả năng chịu hạn của các cây thuốc lá chuyển gen.

3.4. Nghiên cứu chuyển cấu trúc mang gen *GmDREB2* vào cây đậu tương và phân tích cây đậu tương chuyển gen.

## **4. Những đóng góp mới của luận án**

Luận án là công trình đầu tiên ở Việt Nam nghiên cứu có hệ thống, từ việc phân lập, tách dòng phân tử gen *GmDREB2* đến thiết kế vector chuyển gen, tạo cây chuyển gen và phân tích sự biểu hiện gen chuyển *GmDREB2*, cụ thể là:

(1) Gen *GmDREB2* phân lập từ cây đậu tương có kích thước 480 nucleotide, mã hóa cho 159 amino acid. Các trình tự gen *GmDREB2* đã được đăng ký trên

Ngân hàng Gen mang các mã số: LK936507, LK936508, LK936509, HG965097, HG965098, HG965099.

(2) Protein tái tổ hợp GmDREB2 biểu hiện mạnh trên cây thuốc lá chuyển gen. Khi bị hạn, ở các cây thuốc lá chuyển gen có hàm lượng prolin tăng từ 211,17% - 332,44% sau 5 ngày bị stress hạn và tăng từ 262,79% - 466,04% sau 9 ngày bị stress hạn.

(3) Tạo được cây đậu tương chuyển gen mang gen *GmDREB2* và biểu hiện thành công protein tái tổ hợp GmDREB2 trên giống đậu tương DT84.

## **5. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận án**

### **5.1. Về mặt khoa học**

Kết quả nghiên cứu góp phần làm sáng tỏ đặc điểm cấu trúc của gen *GmDREB2* phân lập từ 6 giống đậu tương Việt Nam (DT2008, CB, CBD, ĐT26, ĐT51, ĐVN5). Những cơ sở khoa học của việc sử dụng kỹ thuật chuyển gen nhằm cải thiện đặc tính chịu hạn của cây trồng đã được khẳng định thông qua việc tăng cường protein tái tổ hợp GmDREB2 và biểu hiện chức năng sinh học của gen chuyển *GmDREB2* trên cây thuốc lá và cây đậu tương. Những kết quả bước đầu về tạo cây chuyển gen đã mở ra hướng nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật chuyển gen trong mục đích nâng cao khả năng chịu hạn của cây đậu tương ở Việt Nam.

Các bài báo công bố trên các tạp chí Khoa học - Công nghệ quốc tế và ở trong nước, cùng với 6 trình tự gen công bố trên Ngân hàng Gen là những tư liệu tham khảo có giá trị trong việc nghiên cứu, giảng dạy sinh học và công nghệ sinh học.

### **5.2. Về mặt thực tiễn**

Các trình tự gen *GmDREB2* phân lập được, cấu trúc vector chuyển gen thực vật mang gen *GmDREB2*, các cây thuốc lá chuyển gen tạo được có khả năng

chịu hạn tốt hơn so với cây đối chứng, các cây đậu tương chuyển gen đã góp phần giải quyết những vấn đề cụ thể về việc ứng dụng kỹ thuật chuyển gen trong cải thiện khả năng chịu hạn ở cây đậu tương nói riêng và các cây trồng khác nói chung, mở ra triển vọng ứng dụng công nghệ mới trong thực tiễn chọn giống cây trồng chịu hạn ở Việt Nam.

## **Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU**

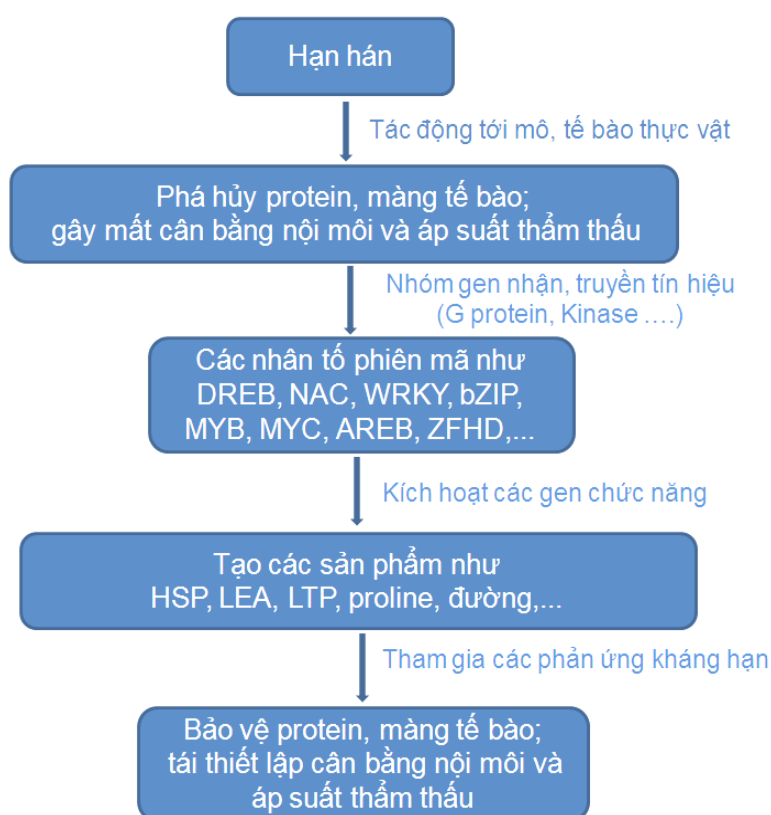
### **1.1. CƠ CHẾ PHÂN TỬ CỦA ĐẶC TÍNH CHỊU HẠN Ở THỰC VẬT**

#### **1.1.1. Cơ chế chịu hạn của thực vật**

Stress phi sinh học là nguyên nhân chính dẫn đến mất mùa trên toàn thế giới, gây thiệt hại đến năng suất bình quân hơn 50% ở các loại cây trồng chính [18]. Trong số các stress phi sinh học, hạn là yếu tố chính làm giảm năng suất cây trồng. Stress hạn phá vỡ sự cân bằng nội môi và phân bố ion trong tế bào [197]. Cây trồng phản ứng với các stress hạn thông qua các con đường truyền tin và phản ứng tế bào như: Sản xuất protein stress, tăng cường các chất chống oxy hóa, tích lũy các chất tan [36]. Các nghiên cứu gần đây cho thấy, hạn gây ra những tác động tiêu cực tới tất cả các cấp độ và các giai đoạn phát triển của thực vật. Để chống chịu với stress hạn, thực vật phải thực hiện thông qua chuỗi các quá trình, với sự tham gia của rất nhiều yếu tố. Khi có hạn, các phản ứng sinh hóa khác nhau được kích hoạt trong cây trồng để tích lũy nhiều loại chất dễ hòa tan, như đường, amino acid, glycine betaine và polyamine để giúp các cây trồng đối phó với hạn [71], tăng lượng chất chống oxy hóa khác nhau, chẳng hạn như glutathione S-transferase (GST), superoxide dismutase (SOD), guaiacol peroxidase (POD) và catalase (CAT) để chống lại điều kiện oxy hóa, giúp cây phục hồi sau một thời gian nhất định bị hạn [12].

Gần đây, những tiến bộ trong việc hiểu biết về biểu hiện gen, cơ chế phiên mã và việc truyền tín hiệu phản ứng với stress hạn của cây trồng đã được công bố [198]. Mặt khác, phân tích sinh học phân tử và di truyền học đã tạo điều kiện thuận lợi cho những khám phá về chức năng gen [155], [170] và được ứng dụng trong kỹ thuật di truyền với việc sử dụng một số gen chức năng hoặc một số gen điều hòa để kích hoạt các cơ chế liên quan đến tính chịu hạn, chịu mặn của cây trồng [176]. Vì vậy, cơ sở phân tử đặc tính chịu hạn của thực vật nói chung và cây đậu tương nói riêng cũng dần được sáng tỏ. Các gen phản ứng với

stress hạn có thể chia thành 2 nhóm chính: Nhóm gen chức năng mà sản phẩm của chúng tham gia trực tiếp vào các phản ứng stress hạn như gen điều hòa áp suất thẩm thấu [167], gen mã hóa các protein chống oxy hóa [100], gen mã hóa protein LEA (Late embryogenesis abundant) [181], gen mã hóa protein vận chuyển LTP (Lipid transfer protein) [111], aquaporin [48]; nhóm gen điều khiển cho ra các sản phẩm bao gồm các nhân tố phiên mã và các protein kinase truyền tin. Các nhân tố phiên mã liên quan đến khả năng chịu hạn đang được quan tâm nghiên cứu bao gồm DREB [24], WRKY [193], [195], bZIP (Basic leucine zipper) [54], MYB (Myeloblastosis oncogene) [90], [103], NCED (Nine-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase) [137] và AP2/ERF [193]. Các protein kinase truyền tin bao gồm: Protein kinase phụ thuộc  $Ca^{2+}$  [80], MAPK (Mitogen activated protein kinase) [112], RPK (Receptor-like protein kinase) [29], PIK (Phosphatidylinositol kinase) [185] và protein kinase serine/threonine [102] (Hình 1.1).



**Hình 1.1.** Cơ chế chịu hạn của thực vật



Sự biểu hiện của các gen cảm ứng với stress hạn liên quan chặt chẽ với quá trình phiên mã. Vì vậy, sự biểu hiện của các gen này chịu ảnh hưởng rất nhiều của môi trường trong và ngoài cơ thể, với nhiều mức độ điều hòa.

Các nhân tố phiên mã (Transcription factors - TFs) đóng vai trò điều khiển quan trọng của những thay đổi trong biểu hiện gen và phản ứng với các stress môi trường. Có thể thấy rõ ở cây trồng, các gen mã hóa nhân tố phiên mã chiếm một phần lớn trong hệ gen. Ví dụ, ở cây *Arabidopsis* có đến 1500 TF trong hệ gen [140]. Cả hai loại: Nhân tố kích hoạt và ức chế quá trình phiên mã đã được sử dụng để nâng cao khả năng chịu hạn cho cây trồng, hầu hết các gen này đã được xác định và phân tích ở cây *Arabidopsis* [19]. Hiện nay, các protein DREB (một trong bốn phân họ lớn của họ AP2/ERF) là nhóm TF được nghiên cứu thành công nhất trong điều kiện phi sinh học, bởi vì nó kích hoạt sự biểu hiện của nhiều gen mục tiêu chịu trách nhiệm kiểm soát các yếu tố liên quan [71]. Wang và cs (2009) đã xác định được trong cây *Arabidopsis* có 474 gen mục tiêu mà các nhân tố phiên mã DREB tác động [183]. Trong số những gen này, có 160 gen có đáp ứng với stress phi sinh học và 27 gen cảm ứng với tình trạng thiếu nước [106].

### 1.1.2. Họ nhân tố phiên mã AP2/ERF

Các nhân tố phiên mã có thể được phân chia thành nhiều loại khác nhau dựa trên cấu trúc vùng liên kết của chúng với sợi DNA. Các nhân tố phiên mã như nhân tố có tác động *trans* và trình tự *cis* giữ vai trò trung tâm hoạt hóa promoter trong biểu hiện của các gen mục tiêu. Kết quả những phân tích về hoạt hóa promoter phản ứng với điều kiện bất lợi, trình tự *cis* và nhân tố có tác động *trans* liên quan đến phản ứng của các gen với điều kiện bất lợi đã được xác định [178].

Họ AP2/ERF là một nhóm lớn các nhân tố phiên mã ở thực vật, bao gồm bốn phân họ lớn: AP2 (APETALA 2), RAV (Related to ABI3/VP1), ERF (Ethylene-responsive element binding factor) và DREB (Dehydration responsive element binding) [148].

### ***1.1.2.1. Cây phát sinh của họ nhân tố phiên mã AP2/ERF***

Họ AP2/ERF là một nhóm lớn các nhân tố phiên mã có chứa miền AP2/ERF. Ở cây *Arabidopsis* chứa 145 locus gen mã hóa các nhân tố phiên mã của họ AP2/ERF [148] và ở lúa có 167 locus [152]. Miền AP2/ERF lần đầu tiên được tìm thấy ở *Arabidopsis homeotic APETALA 2* [74]. Tương tự, miền này cũng tìm thấy ở cây thuốc lá (*Nicotiana tabacum*), đó là yếu tố phản ứng với ethylene (EREBPs) [124]. Miền AP2/ERF có khoảng 60 amino acid, các amino acid này có liên quan chặt chẽ với nhau [184]. Protein thuộc họ AP2/ERF là những nhân tố phiên mã có ở thực vật và người ta cũng tìm thấy miền AP2/ERF ở cả những thực vật bậc thấp như tảo xanh (*Chlamydomonas reinhardtii*) [157], tương đồng với các miền AP2/ERF ở vi khuẩn. Do đó, có giả thuyết cho rằng các miền AP2/ERF được chuyển từ một loài vi khuẩn *Cyanobacterium* cộng sinh hoặc từ một loại vi khuẩn hay virus bởi hiện tượng biến nạp gen [98]. Ở đầu N và ở đầu C của miền AP2/ERF có chứa một đoạn xoắn  $\beta$  tương tự như kiểu xoắn  $\alpha$  có chức năng nhận biết điểm bám trên promoter [158].

Phân tích mối quan hệ và thiết lập cây phát sinh họ AP2/ERF từ bốn phân họ: *Arabidopsis*, *Selaginella moellendorffii*, *Physcomitrella patens* và *Chlamydomonas reinhardtii*, mà đại diện tương ứng là thực vật hạt kín, thông đất, rêu và tảo xanh (Hình 1.2). Mỗi nhánh trong cây phát sinh đại diện cho một nhóm và các thành viên của họ AP2/ERF có thể được chia thành ba nhóm dựa trên cấu trúc tổng thể [141].

Phân họ AP2/ERF trong nhóm *Arabidopsis* gồm 14 thành viên chứa hai miền AP2/ERF, phân họ RAV gồm 6 thành viên có chứa một miền AP2/ERF và thêm một miền B3, trong khi các phân họ khác gồm 125 thành viên chỉ có một miền AP2/ERF [152]. Phân họ AP2/ERF ở thực vật có hạt có thể được chia thành các phân nhóm AP2 và ANT [13].

Sakuma và cs (2002) đã phân tích mối quan hệ của 125 thành viên chứa duy nhất miền AP2/ERF dựa trên cơ sở miền AP2/ERF của nhóm *Arabidopsis*.