

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN**

VŨ THỊ THU THỦY

**TẠO DÒNG CHỊU HẠN BẰNG CÔNG NGHỆ TẾ BÀO VÀ
PHÂN LẬP GEN CYSTATIN LIÊN QUAN ĐẾN TÍNH
CHỊU HẠN Ở CÂY LẠC (*Arachis hypogaea* L.)**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Thái Nguyên - 2011

**BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO
ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN**

VŨ THỊ THU THỦY

**TẠO DÒNG CHỊU HẠN BẰNG CÔNG NGHỆ TẾ BÀO VÀ
PHÂN LẬP GEN CYSTATIN LIÊN QUAN ĐẾN TÍNH
CHỊU HẠN Ở CÂY LẠC (*Arachis hypogaea* L.)**

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Chuyên ngành: **DI TRUYỀN HỌC**
Mã số: **62 42 70 01**

Hướng dẫn khoa học: **1. PGS.TS. CHU HOÀNG MẬU**
2. PGS. TS. NGUYỄN THỊ TÂM

Thái Nguyên - 2011

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan bản luận án là công trình nghiên cứu của tôi dưới sự hướng dẫn của PGS.TS. Chu Hoàng Mậu và PGS.TS. Nguyễn Thị Tâm, sự giúp đỡ của các cán bộ Khoa Sinh – Trường Đại học Sư phạm, Khoa Khoa học Sự sống- Trường Đại học Khoa học, Đại học Thái Nguyên. Các số liệu nêu trong luận án là trung thực. Một số kết quả đã được công bố riêng hoặc đồng tác giả, phần còn lại chưa được ai công bố trong bất kỳ các công trình nào khác.

Tôi xin hoàn toàn chịu trách nhiệm về những số liệu trong luận án này.

Tác giả

Vũ Thị Thu Thủy

LỜI CẢM ƠN

Trước hết, tôi xin được bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới PGS.TS. Chu Hoàng Mậu và PGS.TS. Nguyễn Thị Tâm, những người thầy đã nhiệt tình hướng dẫn tôi trong nghiên cứu khoa học, đã hết lòng giúp đỡ tôi cả về vật chất và tinh thần trong suốt thời gian tôi làm nghiên cứu sinh để tôi hoàn thành bản luận án này.

Tôi xin chân thành cảm ơn Ban chủ nhiệm Khoa Sinh-KTNN, Ban giám hiệu Trường Đại học Sư Phạm – Đại học Thái Nguyên và các bạn đồng nghiệp đã ủng hộ, tạo mọi điều kiện thuận lợi giúp tôi hoàn thành luận án.

Tôi xin chân thành cảm ơn TS. Nguyễn Vũ Thanh Thanh, Trường Đại học Khoa học, Đại học Thái Nguyên; TS. Lê Văn Sơn và phòng Công nghệ tế bào thực vật- Viện Công nghệ Sinh học.

Xin cảm ơn Viện Khoa học Sự sống thuộc Đại học Thái Nguyên, Ban Giám đốc Trung tâm chiếu xạ Quốc Gia (Từ Liêm-Hà Nội) và gia đình bà Ngô Thị Thường, tổ Rừng Vầu, phường Quang Vinh, thành phố Thái Nguyên đã tạo điều kiện để tôi hoàn thành luận án.

Lời cảm ơn sau cùng xin dành cho gia đình và những người thân đã luôn động viên, giúp đỡ, tạo mọi điều kiện thuận lợi cho tôi trong suốt quá trình làm nghiên cứu sinh.

Tác giả luận án

Vũ Thị Thu Thủy

MỤC LỤC

	<i>Trang</i>
Lời cam đoan	i
Lời cảm ơn	ii
Mục lục	iii
Danh mục các ký hiệu, chữ viết tắt	vi
Danh mục bảng	viii
Danh mục hình	x
MỞ ĐẦU	1
Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU	4
1.1. Cây lạc và đặc tính chịu hạn của cây lạc	4
1.1.1. Nguồn gốc và đặc điểm nông sinh học của cây lạc	4
1.1.2. Đặc tính chịu hạn của thực vật và của cây lạc	8
1.2. Nghiên cứu nâng cao khả năng chịu hạn của cây trồng bằng công nghệ tế bào thực vật	15
1.2.1. Chọn dòng tế bào soma trong chọn giống cây trồng	16
1.2.2. Phát sinh biến dị trong quá trình nuôi cấy.	19
1.2.3. Các phương pháp chọn dòng tế bào	20
1.2.4. Một số thành tựu trong chọn dòng chống chịu yếu tố bất lợi của ngoại cảnh	21
1.3. Phân tích, đánh giá các dòng chọn lọc có nguồn gốc từ nuôi cấy mô sẹo	23
1.3.1. Đánh giá khả năng chịu mất nước của mô, tế bào thực vật	23
1.3.2. Đánh giá khả năng chịu hạn ở giai đoạn hạt nảy mầm và giai đoạn cây non.	24
1.3.3. Kỹ thuật RAPD trong đánh giá hệ gen của các dòng chọn lọc	26

1.4.	Gen liên quan đến tính chịu hạn ở cây lạc	28
1.4.1.	Các gen liên quan đến khả năng chịu hạn của cây lạc	28
1.4.2.	Nhóm gen mã hóa protein điều khiển hoạt động phiên mã của các gen chịu hạn	29
1.5.	Cystatin và vai trò của cystatin ở thực vật	30
1.5.1	Đặc điểm cấu tạo và phân loại cystatin	30
1.5.2.	Cấu trúc không gian và cơ chế ức chế của cystatin	33
1.5.3.	Chức năng của cystatin	37
1.5.4.	Gen mã hóa cystatin	38
	Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU	43
2.1.	Vật liệu thực vật	43
2.2.	Hoá chất và thiết bị	45
2.3.	Phương pháp nghiên cứu	45
2.3.1.	Phương pháp nuôi cấy <i>in vitro</i>	46
2.3.2.	Phương pháp nghiên cứu đồng ruộng	49
2.3.3.	Phương pháp sinh lý, hoá sinh	50
2.3.4.	Phương pháp sinh học phân tử	52
2.3.5.	Phương pháp phân tích số liệu	55
2.4.	Địa điểm nghiên cứu	56
	Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN	57
31.	Kết quả tạo dòng chịu hạn bằng kỹ thuật xử lý mô sẹo trong hệ thống nuôi cấy <i>in vitro</i>	57
3.1.1	Sàng lọc dòng mô sẹo chịu tác động của thời khô	57
3.1.2	Ảnh hưởng của tia gamma kết hợp với thời khô đến tỷ lệ sống sót và tái sinh cây của giống lạc L18	66
3.1.3	Đặc điểm nông sinh học của các quần thể lạc R_0 và RM_0	69
3.2.	Kết quả phân tích những dòng lạc chọn lọc qua các thế hệ	74

3.2.1. Đặc điểm nông sinh học các dòng lạc chọn lọc ở thế hệ thứ Nhất và thứ Ba	74
3.2.2. Đánh giá các dòng chọn lọc ở thế hệ thứ Năm	78
3.2.3. Đặc điểm của một số dòng lạc ưu việt	94
3.3. Phân lập và xác định trình tự gen cystatin từ cây lạc	97
3.3.1. Khuyếch đại gen cystatin từ DNA hệ gen của cây lạc	97
3.3.2. Kết quả tách dòng và xác định trình tự gen cystatin	98
3.3.3. Kết quả so sánh trình tự gen và protein cystatin	102
KẾT LUẬN	111
CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN	113
TÀI LIỆU THAM KHẢO	114
PHỤ LỤC	

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU, CHỮ VIẾT TẮT

ABA	: abscisic acid
AhNCED	: Arachis hypogaea 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase
AhSP	: Arachis hypogaea serine proteinase
BAP	: 6 Benzyl amino purin
bp	: base pair
CC	: Corn Cystatin
CHP	: cây hồi phục
CKH	: cây không héo
CTAB	: Cetyltrimethylammonium bromide
CYS	: cystatin
DNA	: Deoxyribose nucleic acid
đtg	: đồng tác giả
EDTA	: Ethylene diamine tetraacetic acid
HSP	: heat shock protein
HvCPI	: Hodeum vulgare cysteine proteinase inhibitor
IPTG	: Isopropyl β -D-1 thiogalactopyranoside
kb	: kilo base
kDa	: kilo dalton
KLK	: khối lượng khô
krad	: kilorad
LB	: Luria- Bertani
LEA	: late embryogenesis abundant
LTPs	: lipid transfer proteins
MS	: Murashige- Skoog
mRNA	: messenger Ribonucleic acid

OC	: Oryza Cystatin
OD	: Optical Density
PCR	: Polymerase chain reaction
PEG	: Polyethylene glycol
PLD α	: Phospholipase D α
RAPD	: Random amplified polymorphic DNA
SDS	: Sodium Dodesyl Sulphate
TAE	: Tris Acetate EDTA
TTC	: 2,3,5 Trichlo tetrazolium chlorit
VuC	: Vigna unguiculata cystatin
X-gal	: 5- Bromo- 4 Cloro- 3 indolyl D galactopyranoside
WC	: Wheat cystatin
2,4-D	: 2.4 Dichlorphenoxyacetic acid
α - NAA	: α - Naphthaleneacetic acid

DANH MỤC BẢNG

	<i>Trang</i>
Bảng 1.1. Diện tích, năng suất và sản lượng lạc của Việt Nam giai đoạn 2005-2009	5
Bảng 1.2. Gen cystatin liên quan với khả năng chống chịu hạn ở một số loài thực vật	41
Bảng 2.1. Một số đặc điểm của 10 giống lạc nghiên cứu	43
Bảng 3.1. Tỷ lệ tạo mô sẹo và khối lượng mô sẹo của 10 giống lạc	58
Bảng 3.2. Độ mất nước của mô sẹo sau xử lý bằng kỹ thuật thổi khô	59
Bảng 3.3. Kết quả kiểm tra khả năng chịu mất nước của mô sẹo 10 giống lạc bằng phương pháp nhuộm TTC	61
Bảng 3.4. Tỷ lệ sống sót của mô sẹo bị xử lý bằng thổi khô sau 4 tuần nuôi phục hồi	63
Bảng 3.5. Tỷ lệ tái sinh cây của mô sẹo sống sót sau 6 tuần	65
Bảng 3.6. Ảnh hưởng của chiếu xạ kết hợp với thổi khô 9 giờ đến tỷ lệ sống sót và tái sinh cây của mô sẹo ở giống lạc L18	66
Bảng 3.7. Đặc điểm nông học của quần thể R ₀ , RM ₀ tái sinh từ mô sẹo mất nước	70
Bảng 3.8. Đặc điểm nông sinh học các dòng lạc chọn lọc ở thế hệ thứ Nhất	75
Bảng 3.9. Đặc điểm nông học các dòng lạc chọn lọc thế hệ thứ Ba	77
Bảng 3.10. Đặc điểm nông sinh học và chất lượng hạt các dòng chọn lọc ở thế hệ thứ Năm	79
Bảng 3.11. Tương quan giữa hoạt độ của α -amylase và hàm lượng đường ở giai đoạn hạt nảy mầm	84
Bảng 3.12. Tỷ lệ cây sống, cây phục hồi và chỉ số chịu hạn tương đối của các dòng chọn lọc ở thế hệ thứ Năm	86

Bảng 3.13.	Số phân đoạn DNA nhân bản ngẫu nhiên và tỷ lệ phân đoạn đa hình của 25 môi trong phản ứng RAPD	90
Bảng 3.14.	Tỷ lệ sai khác về hệ gen của các dòng chọn lọc và giống gốc L18	91
Bảng 3.15.	Chỉ thị RAPD đặc trưng của các dòng lạc chọn lọc	93
Bảng 3.16.	Một số đặc điểm của 3 dòng chọn lọc và giống L18	95
Bảng 3.17.	Sự sai khác về trình tự nucleotide trên gen cystatin của giống và dòng lạc nghiên cứu	103
Bảng 3.18.	Độ tương đồng và độ sai khác đoạn mã hoá một số trình tự gen cystatin	104
Bảng 3.19.	Thành phần amino acid của protein cystatin ở cây lạc	109

DANH MỤC HÌNH

	<i>Trang</i>
Hình 1.1.	Trình tự 102 amino acid của OCI 32
Hình 1.2.	Cấu trúc không gian ba chiều của cystatin thực vật 34
Hình 1.3.	Mô hình cấu trúc ức chế hoạt động của oryzacystatin 36
Hình 2.1.	Mô hình thí nghiệm tổng quát 46
Hình 3.1.	Độ mất nước của mô sẹo các giống lạc 60
Hình 3.2.	Dung dịch nhuộm TTC của mô sẹo giống lạc L18 ở các ngưỡng xử lý thời khô 62
Hình 3.3.	Một số hình ảnh cây tái sinh của giống lạc L18 ở giai đoạn 6 tuần tuổi 68
Hình 3.4.	Các dòng lạc chọn lọc trồng ở vụ xuân 2008 70
Hình 3.5.	Hình ảnh trong chọn dòng chịu hạn ở lạc bằng kỹ thuật nuôi cấy in vitro. 72
Hình 3.6.	Sự biến động về hoạt độ của α -amylase trong điều kiện hạn sinh lý 81
Hình 3.7.	Sự biến động của hàm lượng đường trong điều kiện hạn sinh lý 83
Hình 3.8.	Đồ thị hình rada biểu thị sự khác nhau về khả năng chịu hạn của các dòng lạc chọn lọc, giống L18 và giống L23 . . 87
Hình 3.9.	Hình ảnh điện di sản phẩm RAPD với một số mẫu 89
Hình 3.10.	Sơ đồ mô tả mối quan hệ của 7 dòng chọn lọc với giống gốc L18 ở mức phân tử 92
Hình 3.11.	Hình ảnh quả và hạt của các dòng chọn lọc ở thế hệ thứ Năm 96
Hình 3.12.	Hình ảnh điện di sản phẩm nhân gen cystatin từ cây lạc . . . 97

Hình 3.13.	Hình ảnh điện di sản phẩm colony-PCR	99
Hình 3.14.	Kết quả so sánh trình tự nucleotide gen cystatin của cây lạc	102
Hình 3.15.	Mối quan hệ di truyền của một số đoạn mã hoá gen cystatin thực vật	105
Hình 3.16.	So sánh trình tự amino acid của 4 mẫu nghiên cứu	107

MỞ ĐẦU

1. Lý do chọn đề tài

Lạc (*Arachis hypogaea* L.) là cây thực phẩm, cây công nghiệp lấy dầu trong nhóm cây trồng cạn. Mặc dù cây lạc đã có từ lâu đời nhưng vai trò của cây lạc mới được công bố từ khoảng 100 năm trở lại đây. Trồng lạc mang lại nguồn lợi có giá trị về kinh tế, về dinh dưỡng, đồng thời còn để cải tạo đất rất tốt nhờ khả năng cộng sinh với vi khuẩn *Rhizobium*.... [3]. Trên thế giới, nhu cầu sử dụng và tiêu thụ lạc ngày càng tăng, đó cũng là lý do khuyến khích nhiều nước đầu tư phát triển sản xuất lạc với quy mô liên tục mở rộng [145].

Ở Việt Nam, sản xuất lạc được phân bố trên tất cả các vùng sinh thái nông nghiệp, với khoảng 40% tổng diện tích gieo trồng các cây công nghiệp ngắn ngày. Trong đó, 2/3 diện tích đất trồng lạc phụ thuộc vào nước trời. So với nhiều cây trồng khác, cây lạc có nhu cầu đặc biệt về nước bởi rễ không có lông hút và quả lạc được hình thành dưới đất. Sự biến đổi khí hậu làm cho lượng mưa hàng năm phân bố không đều giữa các vùng miền và các thời điểm trong năm. Trong khi đó, quá trình sinh trưởng và phát triển của cây lạc có những giai đoạn rất mẫn cảm với độ ẩm, nếu những giai đoạn này thiếu nước sẽ làm giảm năng suất, chất lượng của lạc. Chính vì vậy, việc đánh giá để có biện pháp cải tạo giống lạc theo hướng nâng cao khả năng chịu hạn là rất cần thiết.

Các phương pháp đã và đang được nghiên cứu ứng dụng để cải tạo, phát huy tiềm năng của nhiều loại cây trồng như: lai giống, đột biến thực nghiệm, công nghệ tế bào thực vật và chuyển gen ...[30], [76], [131]. Hiệu quả việc ứng dụng công nghệ tế bào thực vật để nâng cao tính chống chịu với các điều kiện bất lợi của môi trường liên tục được khẳng định. Trong quá trình nuôi cấy *in vitro*, do ảnh hưởng của môi trường, đặc biệt là chất kích thích sinh trưởng, các tế bào có thể bị biến đổi vật chất di truyền. Larkin và Scowcroft (1981) gọi những biến dị đó là “biến dị soma” hay “biến dị sinh dưỡng”. Nếu

kết hợp nuôi cấy mô tế bào với xử lý đột biến bằng các tác nhân vật lý hay hoá học thì tần số đột biến có thể tăng thêm [85]. Điều này có ý nghĩa đặc biệt quan trọng trong việc tạo ra nguồn vật liệu khởi đầu cho chọn giống [87]. Ở Việt Nam, sự ra đời của 2 giống lúa DR1 và DR2 có khả năng chịu hạn và chịu lạnh tốt là minh chứng đầu tiên cho những khả năng đó [1]. Đến nay, nhiều dòng cây có nguồn gốc *in vitro* mang tính trạng mong muốn được tạo ra từ quá trình xử lý và nuôi cấy mô sẹo đã được công bố [6], [34], [39], [130].

Khả năng chịu hạn của thực vật là tính trạng do nhiều gen quy định. Do vậy, việc tìm kiếm và phân tích gen liên quan đến đặc tính chịu hạn được nhiều nhà khoa học quan tâm nghiên cứu. Một số gen liên quan đến tính chịu hạn của cây trồng đã được phân lập và công bố như: gen *LEA* [32]; gen *DREB* [113]; gen *P5CS* [10]; gen *NCED*, *AhPLD* [104], [128]... Gen cystatin (*CYS*) của thực vật được công bố đầu tiên trên cây lúa bởi Abe và đtg (1987) [40]. Đến nay, gen *CYS* được phân lập ở nhiều loài thực vật bậc cao, cây một lá mầm và hai lá mầm [17], [92], [95]... Các nghiên cứu về gen cystatin đã bàn luận nhiều tới mối liên quan của nó với khả năng chống chịu hạn, lạnh, mặn [52], [57], [96], [125]...

Xuất phát từ nhu cầu thực tiễn của việc chọn tạo giống lạc theo hướng nâng cao khả năng chịu hạn, chúng tôi đã tiến hành đề tài của luận án: “**Tạo dòng chịu hạn và phân lập gen cystatin liên quan đến tính chịu hạn ở cây lạc (*Arachis hypogaea* L.)**”.

2. Mục tiêu nghiên cứu

- Tạo được dòng lạc có khả năng chịu hạn cao hơn giống gốc bằng công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật.
- Xác định được sự khác biệt trong trình tự của gen cystatin giữa dòng lạc chọn lọc có nguồn gốc từ mô sẹo và các giống lạc có khả năng chịu hạn khác nhau.

3. Nội dung nghiên cứu

- Sàng lọc dòng mô sẹo chịu mất nước dưới tác động của thời khô và tác động của chiếu xạ tia gamma kết hợp với thời khô.

- Phân tích sự biến động một số tính trạng số lượng, chất lượng hạt và khả năng chịu hạn của các dòng chọn lọc.
- So sánh và xác định sự sai khác trong hệ gen của các dòng chọn lọc bằng kỹ thuật RAPD.
- Khuếch đại, tách dòng, xác định trình tự gen cystatin từ một số dòng và giống lạc chọn lọc.

4. Những đóng góp mới của luận án

i) Luận án xây dựng được quy trình chọn dòng lạc chịu hạn theo cách sử dụng kết hợp các phương pháp nuôi cấy mô tế bào, gây đột biến bằng tia gamma và sử dụng chỉ thị phân tử RAPD; tách dòng và so sánh sự khác biệt trình tự gen cystatin liên quan đến tính chịu hạn. Quy trình này có thể rút ngắn thời gian cần thiết và nâng cao hiệu quả cho công tác chọn giống lạc.

ii) Xử lý mô sẹo bởi tia gamma đã làm giảm chiều cao và tỷ lệ tái sinh cây, biến đổi màu sắc và hình dạng lá. Phát hiện được 5 chỉ thị RAPD đặc trưng cho hai dòng lạc chọn lọc RM47 và RM48: RM48/OPA07-750bp; RM48/OPA08-500bp; RM48/OPB05-900bp; RM48/UPC348-200bp; RM47/OPH08-250bp. Phát hiện gen cystatin của cây lạc thuộc nhóm I của phytocystatin, có sự tương đồng cao nhất với cystatin của đậu xanh (81,3%), thấp nhất với cystatin của quả kiwi (42,9%). Gen cystatin có 1 intron và 2 exon, mã hóa cho protein có 98 amino acid. Cystatin của dòng RM48 có nguồn gốc từ mô sẹo được xử lý bởi tia gamma kết hợp với thời khô đã có 7 vị trí amino acid sai khác so với giống gốc L18. Sự thay thế amino acid của dòng RM48 bởi amino acid của giống gốc ở các vị trí 29 (Glu → Asp), 30 (His → Thr), 31 (Asn → Thr), 32 (Lys → Arg), 33 (Lys → Asn), 34 (Glu → Arg), 36 (Gly → Ala).

iii) Xác định được sự khác biệt so với giống gốc L18 về khả năng chịu hạn của ba dòng lạc RM48, RM47, R46 có nguồn gốc từ mô sẹo chịu mất nước được xử lý bởi tia gamma (2krad) kết hợp với thời khô liên tục 9 giờ trong hệ thống nuôi cây *in vitro*.

Chương 1

TỔNG QUAN TÀI LIỆU

1.1. CÂY LẠC VÀ ĐẶC TÍNH CHỊU HẠN CỦA CÂY LẠC

1.1.1. Nguồn gốc và đặc điểm nông sinh học của cây lạc

Cùng với thời gian khám phá ra châu Mỹ, nhiều dẫn liệu đã chứng minh cây lạc có nguồn gốc tự nhiên từ các nước thuộc vùng Nam Mỹ. Theo các nhà nghiên cứu lịch sử tự nhiên, người Inca đã trồng lạc như một loại rau có tên là “ynchis” dọc vùng duyên hải của Peru. Sau đó xuất hiện phổ biến ở châu Âu, châu Phi, châu Á, quần đảo Thái Bình Dương và cuối cùng tới vùng Đông Nam Hoa Kỳ. Tuy nhiên, sản xuất lạc rộng rãi thuộc các nước vùng nhiệt đới và các vùng trên thế giới từ 40⁰ vĩ độ Bắc đến 40⁰ vĩ độ Nam [4].

Đầu tiên, trong nghiên cứu của Linnaeu (1753) đã công bố *Arachis hypogaea* L. là tên một loài. Từ đó cho đến năm 1939 chỉ có chi lạc trồng *Arachis hypogaea* L. được mô tả. Hiện tại, *Arachis* là một chi trong tông *Hedysareae* của bộ đậu (Leguminosae). Chi *Arachis* có 22 loài, đều là loại cây hàng năm sống trên môi trường cạn; có lá kèm và 3 đến 4 lá chét; hoa dạng cánh bướm, màu vàng; có mô phân sinh đốt; quả hình thành dưới đất. Cấu trúc thống nhất trong chi là “tia quả” phình to từ noãn, mỗi quả thắt khoảng 1 đến 5 đốt, mỗi đốt chứa một hạt với 2 lá mầm và một phôi thẳng [8].

Cây lạc có nguồn gốc từ Nam Mỹ và có mặt ở nước ta vào khoảng thế kỷ XVII-XVIII. Theo Tổng cục thống kê năm 2009, với chiều dài hơn 3000 km, trải dọc từ vĩ trí 8⁰ 27' đến 23⁰ 23' vĩ độ Bắc, cây lạc được trồng ở tất cả các vùng sinh thái nông nghiệp của nước ta [145].

Mặc dù còn khó khăn, nhưng ở nhiều địa phương cây lạc vẫn được coi là cây trồng chủ đạo. Năm 2008, FAO đã đánh giá Việt Nam là một trong 10 nước đứng đầu thế giới về sản xuất lạc, với tổng sản lượng đạt 490.000 tấn [144], tuy nhiên sự phát triển cây lạc ở nước ta vẫn ở mức chưa tương xứng với tiềm năng của nó [3]. Kết quả nghiên cứu trên bảng 1.1 cho thấy sự không ổn định về các chỉ số phát triển của cây lạc (các chỉ số được tính so với năm trước bằng 100%). Có nhiều nguyên nhân hạn chế sự phát triển của cây lạc, trong đó có nguyên nhân do hạn hán [145].

Bảng 1.1. Diện tích, năng suất và sản lượng lạc của Việt Nam giai đoạn 2005- 2009

Năm	Diện tích		Năng suất		Sản lượng	
	x 1000 ha	Chỉ số phát triển (%)	tạ/ ha	Chỉ số phát triển (%)	x 1000 tấn	Chỉ số phát triển (%)
2005	169,6	102,2	18,1	102,0	489,3	104,3
2006	246,7	91,5	18,7	103,0	462,5	94,5
2007	254,5	103,2	20,0	107,0	510,0	110,3
2008	255,3	100,0	20,8	104,0	530,2	104,0
2009	249,2	97,6	21,1	101,0	525,1	99,0

Nguồn: *Tổng cục thống kê (2009)*[145]

Các giống lạc của Việt Nam được tuyển chọn từ nhiều nguồn khác nhau, và chúng đều thuộc loại hình thực vật spanish, có tập tính sinh trưởng thành cụm [3].

Sản xuất lạc ở miền Bắc thường tập trung vào hai vụ chính: vụ Xuân Hè (gieo hạt khoảng từ trung tuần tháng 1 đến trung tuần tháng 2 dương lịch) và vụ Thu Đông (gieo hạt khoảng từ trung tuần tháng 8 đến trung tuần tháng 9 dương lịch). Ở thời điểm đầu vụ và cuối vụ thường xảy ra hạn hán, do đó tuyển chọn những giống lạc có thời gian sinh trưởng ngắn để khắc phục những tác động xấu của hạn được nhiều nhà khoa học quan tâm nghiên cứu [4], [8].

Cây lạc mọc từ hạt, sự phát triển của cây lạc chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố sinh thái như nhiệt độ, độ ẩm... Ở điều kiện nhiệt độ từ 25⁰C đến 30⁰C, độ ẩm 50-60% là môi trường rất thích hợp cho sự nảy mầm và phát triển cây lạc [4].

Cây lạc trưởng thành gồm có một thân chính (n) mọc từ đốt cuối trụ trên lá mầm, có độ cao từ 12cm đến 65cm, hai lá mầm đối xứng (n+1). Hệ rễ của cây lạc gồm 1 rễ cọc và các rễ con. Bộ rễ cây lạc phát triển mạnh ở độ sâu từ 5cm đến 35cm, lan rộng khoảng 12- 14cm. Trên đất cát pha, bộ rễ có thể dài 90-130cm. Trên rễ cây lạc có thể có các nốt sần chứa các vi sinh vật thuộc chủng *Rhizobium* làm nhiệm vụ cố định đạm. Vì vậy, việc trồng lạc vừa đem lại nguồn kinh tế có giá trị vừa có tác dụng cải tạo đất [8].

Cây lạc bắt đầu có hoa khoảng từ 20 ngày đến 30 ngày sau khi nảy mầm. Hoa lạc tự thụ phấn (thụ phấn chéo chỉ khoảng 1,0% - 3,9%). Hoa thường nở vào thời điểm có ánh sáng, khi thời tiết lạnh, ẩm ướt hoa có thể nở muộn hơn. Trước khi hoa nở 7- 8 giờ, bao phấn nứt ra, nhụy chỉ tiếp nhận hạt phấn trước 24 giờ và sau 12 giờ khi hoa nở. Khi thụ phấn được khoảng 6 giờ thì sự thụ tinh diễn ra hoàn toàn và sau khi thụ tinh, noãn phát triển xuyên qua hoa để lộ ra tia củ dài, tia củ phát triển đâm xuống đất 2cm mới phát triển thành quả. Nếu sự phát triển của tia củ đã dài tới 15cm mà không tiếp xúc được với đất

sẽ héo ngay. Từ khi hoa lạc thụ tinh đến khi quả chín khoảng 60 ngày [4], [8]...

Theo Ngô Thế Dân và đtg (2000), thời gian sinh trưởng của lạc có thể xác định theo hai cách: (i) cách thứ nhất, tính thời gian sinh trưởng là khoảng thời gian từ khi gieo hạt đến khi thu hoạch, (ii) hoặc cách tính thứ 2 là khoảng thời gian từ khi hạt nảy mầm đến khi thu hoạch. Trong đó, cách thứ hai được dùng nhiều hơn, vì khi gieo hạt nếu gặp điều kiện không thuận lợi như hạn đầu vụ hay lạnh đầu vụ (điều kiện thường gặp ở miền Bắc), hạt lạc có thể nằm trong đất từ 10 ngày đến 20 ngày mới nảy mầm. Đối với cây lạc, sinh trưởng là một đặc điểm của kiểu gen mặc dù chịu ảnh hưởng rất lớn của mùa vụ và môi trường [4]. Thực tế ở miền Bắc, không có giống lạc nào có thời gian sinh trưởng ít hơn 120 ngày. Do đó, dựa vào thời gian sinh trưởng người ta chia các giống lạc thành 3 nhóm: các giống sinh trưởng ngắn ngày (thời gian sinh trưởng ít hơn 120 ngày), giống sinh trưởng trung bình (120 ngày- 140 ngày) và các giống sinh trưởng dài ngày (có thời gian sinh trưởng trên 140 ngày).

Có ba giai đoạn phát triển của cây lạc được xác định rất gắn liền với độ ẩm, đó là: (i) thời kỳ đầu của sinh trưởng dinh dưỡng; (ii) thời kỳ ra hoa và đâm tia xuống đất; (iii) thời kỳ quả chín. Những ảnh hưởng rõ rệt của sự thiếu nước đến cây lạc có thể dễ dàng quan sát như: thiếu nước làm giảm diện tích lá, thiếu nước làm cho cây có ngọn nhỏ hơn, cành và hoa ít hơn... do đó ảnh hưởng đến năng suất và chất lượng lạc [4], [111]... đó cũng là nguyên nhân khiến cho các vùng trồng lạc nhờ nước trời chưa có những đầu tư thích đáng vào cây lạc [4].

Kết quả nghiên cứu đánh giá khả năng chịu hạn của một số giống lạc trong điều kiện có mái che với trồng lạc có sự tưới nước bổ sung giữ ẩm ổn định trên đồng ruộng, cho thấy các yếu tố cấu thành năng suất (số quả chắc, tỷ lệ nhân, năng suất quả khô) của nhóm bị hạn giảm so với nhóm được cung

cấp độ ẩm đầy đủ. Tuy nhiên, các đặc điểm hình thái (hệ sắc tố thân, màu sắc lá, dạng hình sinh trưởng) không liên quan hoặc ít liên quan đến khả năng chịu hạn của cây lạc [7], [14].

1.1.2. Đặc tính chịu hạn của thực vật và của cây lạc

1.1.2.1. Cơ sở sinh lý, hóa sinh và sinh học phân tử của tính chịu hạn

Khả năng của thực vật ngăn ngừa tổn thương khi bị ảnh hưởng các yếu tố bất lợi đó là tính chống chịu (stress resistance) [1].

Trong tự nhiên, hạn hán là hiện tượng thường xuyên xảy ra và liên quan trực tiếp đến vấn đề nước trong cây. Kramer (1983) cho rằng, những tác động của môi trường xung quanh đủ để gây nên mất nước ở thực vật đó là hạn [82]. Khi hạn là yếu tố bất lợi với thực vật sẽ gây ra các mức độ thiệt hại khác nhau. Để chống lại sự mất nước do nguyên nhân từ các tác động bên ngoài, ở thực vật có ba cơ chế sinh lý chủ yếu được thảo luận, đó là cơ chế trốn hạn, cơ chế tránh hạn và cơ chế chịu hạn.

Thực vật có thể hoàn thành chu kỳ sống sớm hơn trước khi sự thiếu nước nghiêm trọng trong đất và trong cây xảy ra. Kiểu chịu mất nước này gọi là trốn hạn (drought escape). Muốn trốn được hạn, cây phải có sức sinh trưởng và phát triển mạnh, có thể ra hoa và tạo quả sớm để thời điểm thiếu nước không ảnh hưởng đến chu kỳ sống của cây. Nhóm cây trốn hạn thường là cây sống ở vùng sa mạc, cây có thời gian sinh trưởng ngắn. Chu trình sống của chúng thường hoàn thành trước khi mùa khô hạn tới [63].

Để tránh hạn, thực vật có thể giữ nước trong tế bào hoặc giảm sự thoát nước ra ngoài cơ thể. Trong đó, phương thức tránh hạn (drought avoidance) chủ yếu của thực vật là hạn chế sự mất nước. Ví dụ, thay đổi độ mở khí khổng, giảm diện tích lá... hoặc nhanh chóng bù lại sự thiếu hụt nước thông qua những biến đổi về hình thái. Định hướng sự phát triển của lá theo hướng giảm sự hấp thụ bức xạ, tăng cường sự hấp thụ nước theo hướng phát triển sâu và rộng của bộ rễ... [49], [60].

Duy trì áp suất thẩm thấu nội bào có tác dụng bảo vệ hoặc duy trì sức sống, độ đàn hồi của tế bào ngay cả khi bị mất nước cục đoạn, đó là khả năng chịu hạn (drought tolerance). Trong điều kiện hạn hán, áp suất thẩm thấu của tế bào được điều chỉnh tăng lên giúp cho tế bào có thể duy trì lượng nước. Tuy nhiên, ở cùng một thời điểm bị hạn, thực vật sử dụng nhiều hơn một cơ chế để chống hạn [60], [98].

Tìm hiểu bản chất hoá sinh và sinh học phân tử của tính chịu hạn là mối quan tâm của nhiều nghiên cứu [12], [47], [48], [49], [60].... Nghiên cứu tính chống chịu hạn và cấu trúc tế bào người ta nhận thấy, hàng loạt những biến đổi sâu sắc xảy ra ở nhiều cấp độ trong các giai đoạn khác nhau và liên quan đến hoạt động của các gen. Nghiên cứu của Bray (1993) về những sản phẩm của gen tham gia bảo vệ tế bào khi tế bào bị thiếu nước được tiếp cận theo hướng: (1) hoạt động của nhóm gen tạo sản phẩm bảo vệ tế bào (protection of cellular) và (2) hoạt động của nhóm gen tham gia điều chỉnh áp suất thẩm thấu trong tế bào (osmotic adjustment) [51].

Theo hướng thứ nhất, (i) Sản phẩm của gen là các chất môi giới phân tử. Chất môi giới phân tử tham gia vào quá trình tạo cấu trúc không gian đúng cho các phân tử protein được tạo thành trong tế bào, hay tạo cấu trúc đúng cho những phân tử protein bị biến tính trong điều kiện cực đoạn. Một protein lạ được xác định là cần thiết để sắp xếp cấu trúc đúng của một phức hợp enzyme lớn trong lạp lục, nhưng protein lạ này không liên quan đến việc lắp ráp cuối cùng của phức enzyme. Điều này nhanh chóng được xác định rằng, cùng với những protein chỉ đạo lắp ráp chính, loại protein lạ giống hệt với một trong nhiều protein được tổng hợp mạnh khi các tế bào gặp nhiệt độ cao. Vì thế, nhóm chất môi giới phân tử thứ nhất gọi là "protein sốc nhiệt", hoặc HSP (HSP- heat shock protein).

Trong điều kiện bình thường các HSP vẫn được tổng hợp, nhưng khi gặp các điều kiện bất lợi như hạn hán, nhiệt độ cao, muối cao... chúng được

tổng hợp gia tăng. HSP ở thực vật gồm nhiều loại khác nhau về kích thước, khối lượng và sự khu trú trong tế bào. HSP70 là chất môi giới phân tử có kích thước khoảng 70kDa, nhóm này tìm thấy trong chất nguyên sinh của các tế bào. Bình thường, HSP70 gắn với polypeptide đang tổng hợp trên ribosome, do đó chuỗi polypeptide được ổn định cho đến khi tổng hợp xong. Trong điều kiện cực đoan, HSP70 ngăn chặn sự co cụm kết tủa protein [71]. HSP60 (chất môi giới phân tử có kích thước khoảng 60kDa) được tìm thấy trong một số bào quan của sinh vật nhân thực như ty thể, lục lạp. HSP60 có cấu trúc hình trụ, có vai trò tạo cấu trúc đúng cho protein.

(ii) Các sản phẩm của gen tham gia đào thải những chất bị biến tính, những chất có khả năng gây độc cho tế bào khi tế bào gặp tác động của điều kiện bất lợi. Các chất này bao gồm ubiquitin, protease, catalase, supeoxid dismutase... Do vậy, hoạt động của nhóm chất này sẽ góp phần giải độc và bảo vệ tế bào.

(iii) Các chất bảo vệ enzyme, ức chế hoạt động của các enzyme thủy phân khác...do đó làm hạn chế sự phân giải những chất có hoạt tính enzyme và bảo vệ các cấu trúc trong tế bào, nhóm này gọi chung là protease inhibitor. Nhóm chất ức chế enzyme gồm nhiều loại, tuy nhiên sự hiểu biết về chúng còn hạn chế [70].

Theo hướng thứ 2, việc điều chỉnh áp suất thẩm thấu của tế bào khi bị mất nước là rất quan trọng. Các chất điều hòa áp suất thẩm thấu có vai trò khác nhau trong việc giữ và lấy nước vào tế bào. Đó là, việc điều chỉnh các kênh ion trên màng tế bào. Sản phẩm của gen thay thế vị trí nước nơi xảy ra các phản ứng hoá sinh, hoặc tương tác với lipid, protein màng tế bào, ngăn chặn sự phá huỷ màng tế bào và ngăn chặn sự phá huỷ các protein khác. LEA (late embryogenesis abundant) là protein giàu amino acid ưa nước, không chứa cysteine và tryptophan, do đó rất thích hợp với vai trò mang nước và giúp duy trì nhu cầu nước của tế bào [110]. LTPs (lipid transfer proteins) là một nhóm protein hỗ trợ hình thành lớp cutin, lớp sáp do đó bảo vệ mô tránh mất nước.

LTP tăng vận chuyển phospholipid tới màng, do đó tăng độ bền của màng và khả năng giữ nước của tế bào [78]. Sản phẩm của gen điều chỉnh áp suất thẩm thấu bằng cách điều khiển sự ra vào nước qua màng không bào. Bên cạnh đó, các chất như: ion K^+ , proline, esteoic, các chất đường sucrose, manitol... là những chất đóng vai trò quan trọng trong việc tăng cường áp suất thẩm thấu của tế bào.

1.1.2.2. Đặc tính chịu hạn của cây lạc

Đặc tính chịu hạn của cây trồng nói chung và của cây lạc nói riêng được cấu thành bởi một số yếu tố như diện tích lá, hàm lượng diệp lục trong lá, hiệu suất quang hợp, thoát hơi nước và hiệu quả sử dụng nước, bộ rễ cây lạc.

Diện tích lá và hàm lượng diệp lục trong lá

Lá lạc thuộc loại lá kép, với 3 hoặc 4 lá chét. Tổng số lá trên cây tăng khoảng từ ngày 21 đến ngày thứ 90-100 sau khi trồng. Ảnh hưởng của thiếu nước rõ nhất là giảm độ tăng trưởng của tế bào trên toàn bộ cây, như vậy diện tích quang hợp sẽ giảm dẫn đến giảm sức phát triển của cây.

Chỉ số diện tích lá có thể được cải thiện bởi tổ hợp các chất kích thích sinh trưởng và nguyên tố vi lượng [33]. Nghiên cứu xác định chỉ số diện tích lá cho thấy, đây là chỉ tiêu có mối liên quan với hàm lượng diệp lục, mật độ chất diệp lục, hiệu quả sử dụng nước... [119], [120].

Diệp lục là sắc tố quang hợp chủ yếu của cây trồng. Vì vậy, mật độ chất diệp lục rất quan trọng trong việc đánh giá khả năng quang hợp của cây. Mật độ chất diệp lục được tính bằng hàm lượng chất diệp lục trên một đơn vị diện tích lá. Mật độ chất diệp lục ổn định trong thời gian hạn hán có thể là một chỉ tiêu đầy hứa hẹn trong việc lựa chọn dòng, giống lạc có khả năng chịu hạn [44]. Đó cũng là lý do để nhóm tác giả Nguyễn Tấn Lê và Vũ Đình Ngân (2010) tiến hành thăm dò ảnh hưởng của $CaCl_2$ và tổ hợp một số nguyên tố vi lượng để cải thiện hàm lượng diệp lục trong lá [11].

SCMR (SPAD chlorophyll meter reading) phản ánh đặc tính hoạt động hấp thụ ánh sáng của lá. Chỉ số SCMR phụ thuộc vào hàm lượng diệp lục trên mỗi đơn vị diện tích lá. Arunyanark và đtg (2009) cho rằng, có thể sử dụng SCMR như một công cụ để đánh giá nhanh về tình trạng chất diệp lục tương đối của lạc cũng như gián tiếp lựa chọn khả năng chịu hạn của cây lạc [43].

Hiệu suất quang hợp

Hiệu suất quang hợp là chỉ tiêu đánh giá trên cơ sở hàm lượng vật chất khô của cây trồng. Hiệu suất quang hợp phản ánh năng suất cây trồng. Hiệu suất quang hợp thay đổi theo các giai đoạn sinh trưởng của cây. Giai đoạn nào có hoạt động quang hợp mạnh nhất thì có hiệu suất quang hợp cao nhất.

Có nhiều cách xác định hiệu suất quang hợp của cây như: xác định cường độ quang hợp; xác định khối lượng vật chất khô.... Trong đó, cường độ quang hợp của cây được tính thông qua lượng CO₂ cây hấp thụ, lượng O₂ cây thải ra hay lượng chất hữu cơ được tích lũy trên một đơn vị diện tích lá trong một đơn vị thời gian xác định [11], [33], [44]... Cường độ quang hợp đánh giá khả năng quang hợp của các quần thể cây trồng khác nhau. Cường độ quang hợp là một chỉ tiêu thay đổi, tùy thuộc vào giống cây trồng, các cơ quan, giai đoạn sinh trưởng khác nhau của cây, điều kiện ngoại cảnh... Theo Arunyanark và đtg (2008) hạn hán làm giảm đáng kể khối lượng chất khô của cây [44].

Ở thực vật, khi mất một lượng nước khoảng 5-10% sẽ thuận lợi cho quá trình quang hợp. Nếu độ bão hòa của nước trong cây thiếu hơn 10% thì hiệu suất quang hợp bị giảm sút. Quang hợp ngừng khi hàm lượng nước trong cây thiếu khoảng từ 30% trở lên. Đặc tính này là biểu hiện thích nghi của bộ máy quang hợp trên môi trường cạn. Tuy nhiên, tùy theo khả năng chống chịu hạn của cây mà mức độ giảm sút quang hợp sẽ khác nhau. Thực vật có khả năng chống chịu hạn tốt, khi thiếu nước hiệu suất quang hợp sẽ giảm ít hơn.

Ribulose 1,5 diphosphat cacboxylase xúc tác sự chuyển hóa ribulose 1,5 diphosphat (RiDP) trong giai đoạn đầu tiên của quá trình cố định CO₂.

Ribulose 1,5 diphosphat cacboxylase có nhiều trong lá. Khi thiếu nước, khí khổng đóng lại, hoạt tính của ribulose 1,5 diphosphat cacboxylase bị giảm sút, khả năng cố định CO₂ giảm... dẫn đến hiệu suất quang hợp của lá giảm. Vì vậy, hoạt tính của ribulose 1,5 diphosphat cacboxylase ổn định được cho là yếu tố quan trọng góp phần kháng hạn hán trong cây lạc [108].

Thoát hơi nước và hiệu quả sử dụng nước

Thoát hơi nước là sự bay hơi của nước từ cơ thể thực vật. Quá trình thoát hơi nước xảy ra chủ yếu ở lá, khi khí khổng mở rộng cho việc lấy CO₂ vào quá trình quang hợp. Quá trình thoát hơi nước của thực vật thúc đẩy sự vận chuyển nước và các chất khoáng từ rễ lên lá, đồng thời làm mát lá cây khi bị đốt nóng.

Nghiên cứu sự phân bố khí khổng ở cây lạc nhận thấy, số lượng khí khổng như nhau ở cả 2 mặt lá. Do đó, trong thời điểm sinh trưởng mạnh, so với các cây trồng khác cây lạc cần cung cấp lượng nước gấp đôi. Để chống mất nước, cây lạc có đặc tính khép lá lại và hướng lá song song theo hướng tia nắng chiếu tới [4].

Hiệu quả sử dụng nước của cây lạc được tính bằng tỷ lệ giữa sinh khối thu được trên đất với sự thoát hơi. Theo Songsri (2009), hạn hán làm giảm hiệu quả sử dụng nước, giảm khối lượng rễ khô và chỉ số thu hoạch. Kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng, cây lạc có chỉ số diện tích lá thấp, SCMR cao sẽ cho hiệu quả sử dụng nước lớn [119].

Bộ rễ cây lạc

Hoạt động của bộ rễ cây lạc với đặc tính chịu hạn, được xác định thông qua chỉ số RLD (root length density). RLD là chỉ số liên quan đến chiều dài và mật độ phân bố của rễ, chỉ số này được tính bằng tỷ lệ của tổng chiều dài rễ (cm) trên một đơn vị khối lượng đất (cm³). Songsri và dtg (2008) nhận thấy, ở giống lạc có chiều dài rễ lớn từ 40-100cm (RLD_{40 to 100cm}) thì có chỉ số chịu hạn cao và do đó ổn định năng suất quả và chỉ số thu hoạch trong điều kiện hạn hán [120].

Serine proteinase là enzyme thuộc nhóm subtilisin, hoạt động được trong điều kiện thiếu nước (các enzyme hoạt động tối thích trong môi trường kiềm). Serine proteinase có tính đặc hiệu nhóm tương đối, hoạt động của serine proteinase thủy phân nhiều loại liên kết peptide cũng như các liên kết ester, nhất là những liên kết được tạo thành từ các amino acid thơm. Dưới tác dụng của enzyme này, một số triglyceride cũng có thể bị thủy phân. Nghiên cứu của Drame và đtg (2007) cho thấy, sự biểu hiện của gen *AhSP* (*Arachis hypogaea* serine proteinase) mã hóa serine proteinase trên cây lạc giảm mạnh với sự thiếu hụt nước, đặc biệt đối với giống chịu hạn tốt. Khi thủy hóa trở lại, giống chịu hạn tốt cũng là giống phục hồi biểu hiện của gen *AhSP* nhanh hơn [59].

Phân tích của Akcay và đtg (2010) cho rằng, mức độ tích tụ proline, khả năng hoạt động của ascorbate peroxidase và catalase tăng là những cơ chế quan trọng để duy trì khả năng chịu hạn ở cây lạc [42].

Phospholipase là enzyme thủy phân lipid, có vai trò đối với hoạt động bảo vệ màng tế bào. Hoạt động của phospholipase tạo ra nhiều lipid đóng vai trò quan trọng trong cấu trúc màng tế bào như phosphatidic acid, diacylglycerol hay inositol-triphosphat. Phospholipase gồm nhiều loại, khác nhau về vị trí phân cắt trên phosphatidic acid, pH tối ưu, kích thước phân tử... [104], [128]. Jacob và đtg (1999) đã phát hiện, chất đồng phân $PLD\alpha$ liên kết với abscisic acid có tác dụng điều khiển sự đóng kín lỗ khí trong suốt quá trình hạn hán [77]. Do đó, sự gia tăng tích lũy bản sao của $PLD\alpha$ góp phần giảm bớt sự mất nước trong tế bào và bảo vệ màng tế bào của cây lạc [59].

Hoạt động tích lũy protein như LEA cũng được chứng minh đồng thời xảy ra trong phản ứng với sự thiếu hụt nước ở cây lạc. Tích lũy protein LEA để bảo vệ màng tế bào khỏi sự phá hủy và chống chịu với sự mất nước. Trong lá lạc hàm lượng protein LEA được tích lũy cao khi có sự thiếu hụt nước, sự tích lũy hàm lượng protein LEA không rõ rệt là kết quả nhận được trong cây lạc đủ nước [59].

Điều chỉnh áp suất thẩm thấu của cây lạc, hoạt động tạo các chất tham gia vào quá trình điều chỉnh áp suất thẩm thấu của thực vật nói chung và cây lạc nói riêng là quá trình phức tạp với sự tham gia của nhiều gen, enzyme và protein. Nghiên cứu sự biến động hàm lượng protein và proline ở giai đoạn cây non vào các thời điểm trước khi gây hạn với thời điểm sau 5 và 9 ngày gây hạn, Akcay và đtg (2010), Dinakar và đtg (2008) nhận thấy, hàm lượng proline có sự gia tăng khi thời gian gây hạn kéo dài và có mối tương quan thuận với khả năng chịu hạn của cây lạc [42], [56].

Abscicis acid (ABA) là hoocmon thực vật liên quan đến việc điều khiển quá trình đóng mở khí khổng. Sự sinh tổng hợp ABA trong cây được điều khiển bởi 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) [69]. Ở cây lạc, gen *AhNCED1* (*Arachis hypogaea* 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase) mã hóa tổng hợp NCED được nghiên cứu sự biểu hiện cho thấy, hoạt tính của NCED tăng lên đáng kể ở lá và thân cây lạc đáp ứng với tình trạng mất nước của cây [127].

Như vậy, tất cả các loài thực vật đều có đặc tính sống thích hợp trong tình trạng thiếu hụt nước. Khi sự thiếu nước do hạn hán, thực vật sẽ phản ứng bằng nhiều cơ chế khác nhau. Cây lạc có khả năng chịu hạn kém. Khi gặp hạn, cây lạc phát huy đặc tính chịu hạn thông qua những thay đổi về hình thái, sinh lý, hóa sinh. Cho nên, việc tìm kiếm các yếu tố cấu thành đặc tính chịu hạn của cây trồng nói chung và cây lạc nói riêng để nâng cao khả năng chống chịu của cây là cần thiết.

1.2. NGHIÊN CỨU NÂNG CAO KHẢ NĂNG CHỊU HẠN CỦA CÂY TRỒNG BẰNG CÔNG NGHỆ TẾ BÀO THỰC VẬT

Hiện nay, nuôi cấy mô tế bào thực vật đang được ứng dụng trong các lĩnh vực nhân giống *in vitro*, phục tráng và tạo cây sạch bệnh, nuôi cấy bao

phần và tạo dòng thuần, dung hợp tế bào trần và lai vô tính, cải tiến và nâng cao khả năng chống chịu của cây trồng.

Ứng dụng công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật nhằm nâng cao khả năng chịu hạn của cây trồng được tiếp cận theo hướng nghiên cứu hệ thống tái sinh phục vụ chuyển gen và chọn dòng tế bào soma. Chuyển gen ở thực vật có thể thực hiện trực tiếp hoặc gián tiếp, tuy nhiên thực vật bậc cao có thành tế bào dày, bền vững nên kỹ thuật chuyển gen gián tiếp tỏ ra ưu thế hơn. Để tạo được cây chuyển gen bằng phương pháp chuyển gián tiếp phải hoàn thiện hệ thống tái sinh cây. Đến nay, việc chuyển một số gen điều khiển và gen hoạt hóa sự biểu hiện của nhóm gen liên quan đến tính chịu hạn ở thực vật đã được công bố bởi Kosmas và đtg (2006), Ying và đtg (2009) [81], [131]. Nghiên cứu của Wan và đtg (2006) về chuyển gen *AhNCED1* điều khiển sinh tổng hợp ABA của cây lạc vào cây *Arabidopsis* đã cho thấy, hàm lượng ABA của cây *Arabidopsis* tăng lên trong điều kiện thiếu nước [127].

Các dòng tế bào được tạo ra từ nhiều phần khác nhau của cây. Quá trình nuôi cấy các dòng tế bào làm xuất hiện nhiều biến dị. Việc chọn dòng biến dị soma, tái sinh cây và tạo cây hoàn chỉnh sẽ là nguồn vật liệu khởi đầu rất tốt cho quá trình chọn tạo giống theo định hướng tăng cường khả năng chống chịu [1], [31], [80].

1.2.1. Chọn dòng tế bào soma trong chọn giống cây trồng

Tất cả các tế bào của một cơ thể đều mang bộ máy thông tin di truyền giống nhau, mỗi tế bào bất kỳ lấy từ cơ thể thực vật đều có khả năng tiềm tàng để phát triển thành một cá thể hoàn chỉnh, đó là *tính toàn năng của tế bào thực vật*. Điều này đã được các nhà khoa học chứng minh bằng các thí nghiệm nuôi cấy mô và tế bào thực vật.

Mô hoặc quần thể tế bào nuôi cấy bao gồm một số lượng lớn các tế bào không đồng nhất. Vì thế quần thể tế bào nuôi cấy có thể xem như quần thể thực vật mà ở đó cũng diễn ra sự thay đổi về kiểu gen, kiểu hình và tuổi. Khi những tế bào được tái sinh thành cây sẽ thể hiện thay đổi đó ở mức độ cơ thể. Thậm chí có những quần thể tế bào phát triển từ một tế bào ban đầu nhưng trong suốt quá trình sinh trưởng và phát triển đến khi hình thành một cơ thể hoàn chỉnh diễn ra nhiều thay đổi di truyền do ảnh hưởng của các yếu tố môi trường nuôi cấy, đặc biệt là các chất điều hoà sinh trưởng.

Kỹ thuật chọn dòng tế bào đối với thực vật bậc cao nhằm mục đích: (i) Chọn dòng chống chịu với điều kiện bất lợi của ngoại cảnh phi sinh học như: nóng, lạnh, phèn, mặn, hạn, úng... (ii) Chọn dòng tế bào kháng các độc tố do tác nhân sinh học gây ra như: độc tố do nấm và vi khuẩn gây bệnh tiết ra, các loại kháng sinh do vi sinh vật sản sinh ra... (iii) Chọn dòng sản xuất dư thừa các loại sản phẩm chủ yếu là amino acid nhằm mục tiêu xây dựng qui trình sản xuất theo quy mô công nghiệp các sản phẩm đó. (iiii) Chọn các dòng mang những đặc điểm đánh dấu để nghiên cứu di truyền (genetic marker).

Tế bào nuôi cấy *in vitro* có tỷ lệ biến dị di truyền lớn, vì thế có thể chọn được các cá thể đột biến nhanh hơn và có hiệu quả hơn so với các phương pháp chọn giống thông thường khác áp dụng trên cây nguyên vẹn [22]. Nếu kết hợp với xử lý đột biến thì tần số đột biến càng cao hơn [35], [101]. Kỹ thuật nuôi cấy mô và tế bào còn cho phép làm giảm đáng kể thời gian cần thiết để chọn được những tính trạng mong muốn [1], [36].

Theo Lê Trần Bình và đtg (1998), kỹ thuật chọn dòng tế bào soma chống chịu với các yếu tố bất lợi của môi trường bao gồm các bước: (1) Tạo mô sẹo trên môi trường MS cơ bản, bổ sung 2,4-D. Xử lý mô sẹo với các điều kiện cực đoan của môi trường (nóng, lạnh, hạn, nhôm, muối...) ở ngưỡng dưới mức gây chết và chọn dòng tế bào mô sẹo chống chịu được các điều kiện bất

lợi; (2) Chọn lọc các dòng mô sẹo sống sót để đưa lên môi trường tái sinh cây và tạo cây hoàn chỉnh; (3) Trồng, theo dõi và phân tích di truyền các dòng chọn lọc được; (4) Đánh giá khả năng chống chịu ở mức cây hoàn chỉnh, phân tích các đặc điểm hóa sinh và sinh học phân tử [1].

Nguyên liệu dùng cho chọn dòng tế bào thực vật có thể là mô sẹo, tế bào nuôi cấy dịch lỏng hoặc tế bào trần. Trong đó, thường dùng hơn cả trong chọn dòng tế bào thực vật là mô sẹo.

Mô sẹo (callus) là khối mô thực vật gồm những tế bào chưa phân hoá, có khả năng phân chia liên tục. Trong công nghệ tế bào thực vật, nuôi cấy mô sẹo là một kỹ thuật cơ bản cho phép biến đổi các bộ phận khác nhau của cây thành mô sẹo và từ đó tái sinh được cây hoàn chỉnh. Trong nuôi cấy *in vitro*, mô sẹo được tạo ra bằng cách nuôi cấy các cơ quan của thực vật (lá, hoa, quả, thân...) ở môi trường và điều kiện nuôi cấy thích hợp. Sử dụng mô sẹo làm nguyên liệu chọn dòng tế bào thực vật có ưu điểm là đơn giản và thường có tính biến động di truyền cao. Mô sẹo được sử dụng để chọn các dòng chống chịu với tác nhân ngoại cảnh phi sinh học, chịu bệnh và các dòng cho năng suất thứ cấp cao.

Nghiên cứu tạo mô sẹo và tái sinh cây từ mô lá của lạc, McKently và đtg (2000) đã nhận thấy cây hoàn chỉnh trồng trong nhà lưới có khả năng sinh trưởng, phát triển bình thường, không có sự biến đổi về kiểu hình [95]. Từ những mảnh lá mầm trên môi trường thích hợp, Nguyễn Xuân Tài và đtg (2005) đã tạo mầm đa chồi và một số dòng cây xanh có nguồn gốc từ giống lạc L14 sinh trưởng được khi nuôi cấy ở nhà lưới. Quần thể R_0 trồng trong nhà lưới có sự xuất hiện biến dị về hình thái từ dạng đứng sang dạng trung gian (khoảng 35%). Thời gian xuất hiện hoa đầu tiên của cây tái sinh muộn hơn giống gốc khoảng 20-30 ngày. Phân tích đa hình DNA của quần thể cây tái sinh thể hệ R_0 bằng chỉ thị SSR các tác giả cũng nhận được sự khác biệt ở

mức DNA từ 8% đến 35% so với giống gốc [22]. Mô sẹo lạc có nguồn gốc từ thân mầm chịu ảnh hưởng của tia gamma có khả năng tái sinh cao hơn. Nghiên cứu cũng thu được một số cây tái sinh không bình thường, đặc biệt là hình dạng lá [101].

1.2.2. Phát sinh biến dị trong quá trình nuôi cấy

Điều kiện nuôi cấy mô, tế bào làm phát sinh biến dị với tần số xuất hiện khoảng 10^{-5} - 10^{-10} , vì trong môi trường nuôi cấy có các chất kích thích sinh trưởng với nồng độ cao. Có thể kết hợp với xử lý đột biến hoặc xử lý stress để tăng tần số đột biến từ 10-100 lần [87]. Do vậy, việc phối hợp gây đột biến cùng với quá trình nuôi cấy mô tế bào sẽ góp phần chọn cá thể đột biến nhanh hơn và hiệu quả hơn so với những phương pháp chọn giống thông thường khác áp dụng trên cây nguyên vẹn [58].

Tác nhân đột biến có thể sử dụng trong quá trình nuôi cấy mô gồm nhiều loại, đó là các tác nhân hoá học gây đột biến như ethylen imine, nitroso methyl urea ... Các tác nhân vật lý gây đột biến như: nhiệt độ, tia bức xạ không gây ion hoá (tia UV), mức năng lượng của tia UV chỉ có thể dẫn đến những đột biến điểm hay đột biến cấu trúc nhiễm sắc thể. Tia bức xạ gây ion hoá (tia X, tia gamma), trong sinh học thường dùng tia gamma từ nguồn phóng xạ Co^{60} để gây đột biến vì có bước sóng ngắn (1,25 MeV) nên độ xuyên sâu cao hơn, đây cũng là loại tia được dùng nhiều để gây đột biến và cải tạo giống cây trồng [6], [29], [36], [112].

Tác nhân làm phát sinh đột biến tác động không giống nhau vào các loài sinh vật khác nhau, không giống nhau ở các bộ phận cơ quan trong cơ thể, trong đó thường thấy sự mẫn cảm của hạt nảy mầm hơn so với hạt khô; các cơ quan sinh dưỡng nhạy cảm hơn hạt ngủ nghỉ... Vì vậy, để thu được tần số đột biến cao, với mỗi loại cây trồng cần phải chiếu xạ ở liều lượng đủ lớn để gây

ra những biến dị di truyền có lợi mà không gây chết cũng như tăng độ bất thụ, làm ảnh hưởng đến công tác chọn tạo giống sau này. Để xác định hiệu quả tác động của chiếu xạ, người ta thường xác định liều lượng tới hạn, tức là liều lượng còn 30-40 % số cây sống sót sau khi chiếu xạ. Tuy nhiên, người ta thường dùng liều chiếu xạ nhỏ hơn liều tới hạn từ 1,5 – 2,0 lần, tốt nhất là dùng những liều làm giảm tỷ lệ nảy mầm và ít kìm hãm sinh trưởng [21].

Xác định liều chiếu xạ gây ảnh hưởng đến sinh vật, các đơn vị là rad và ronghen thường được dùng tương đương nhau và được tính là lượng phóng xạ làm cho 1g mô sinh vật sống bị chiếu xạ hấp thụ năng lượng; ngoài ra có đơn vị gray và 1kilorad.

Nuôi cấy mô phát sinh biến dị, kết hợp nuôi cấy mô với các tác nhân đột biến để gia tăng thể đột biến. Tuy nhiên, khái niệm đột biến có lợi là những dấu hiệu do người nghiên cứu tự quy ước, bởi vậy tất cả những dấu hiệu đột biến được chọn để nghiên cứu như: thấp cây, nhiều nhánh, chín sớm, năng suất cao, khối lượng quả, hạt lớn...đều xếp vào các đột biến có lợi [6]. Đột biến làm xuất hiện những tính trạng mới, các tính trạng mới di truyền cho thế hệ sau thông qua sinh sản hữu tính sẽ chịu sự phân ly di truyền theo quy luật tự nhiên [80], [88]...

1.2.3. Các phương pháp chọn dòng tế bào

Chọn dòng tế bào có thể thực hiện theo nhiều cách: trực tiếp, gián tiếp và chọn tổng thể.

Chọn dòng trực tiếp thông qua ưu thế về sinh trưởng hay sự khác biệt về màu sắc có thể chọn được dòng tế bào mong muốn từ quần thể tế bào. Điều kiện chọn lọc ở đây là các chất chọn lọc ở những nồng độ khác nhau gây tác động trực tiếp lên sinh trưởng của tế bào. Phương pháp chọn trực tiếp thường được ứng dụng để chọn dòng chống chịu và những dòng cho sản phẩm thứ cấp

cao. Tác nhân chọn lọc thường được sử dụng phải kể đến polyethylene glycol (PEG). Các công trình nghiên cứu sử dụng PEG của Matheka và đtg (2008) về chọn dòng mô sẹo ngô chịu hạn [94], chọn dòng lúa chịu hạn của Lê Thị Bích Thủy (2008) [34]... đã được công bố.

Trong trường hợp chọn dòng gián tiếp, đặc điểm của dòng được chọn là kết quả biểu hiện khuyết tật của tế bào. Trên môi trường chứa ClO_3 những tế bào có nitrat reductase sử dụng ClO_3 như NO_3 và khử thành clorit. Clorit tác dụng như một độc tố, cho nên chỉ những tế bào không có nitrat reductase mới sống sót [100].

Chọn lọc tổng thể các tế bào dị dưỡng thực vật thường được chọn bằng phương thức xử lý đột biến và nuôi trên môi trường có chứa yếu tố dinh dưỡng cần thiết, mà yếu tố này có khi lại chính là nhân tố gây đột biến.

1.2.4. Một số thành tựu trong chọn dòng chống chịu yếu tố bất lợi của ngoại cảnh

Đối với các nhà trồng trọt cũng như với chiến lược phát triển cây trồng, việc chọn và tạo ra giống cây có khả năng chống chịu những tác động ngoại cảnh phi sinh học và tác động của các chất hoá học là mục tiêu của nhiều chương trình nghiên cứu. Những giống được chọn lọc ngoài các chỉ tiêu về năng suất và phẩm chất còn cần phải có khả năng thích nghi với những điều kiện hết sức đa dạng để phát triển tốt ở nhiều vùng sinh thái khác nhau. Yếu tố bất lợi của môi trường gồm nhiều loại như phèn, chua, mặn, hạn, nóng, lạnh... Nuôi cấy mô và tế bào có thể đóng góp một phần quan trọng trong việc chọn tạo dòng chống chịu các yếu tố bất lợi đó.

Bằng công nghệ tế bào thực vật, các nhà khoa học đã nhận được những dòng chịu muối NaCl từ mô sẹo lúa [37], thuốc lá [13], lúa mì [117]. Kết quả nghiên cứu của Singh và đtg (2004) cho thấy, ABA là chất có liên quan đến

việc tổng hợp các protein mới (đặc biệt các protein có khối lượng phân tử 26 kDa) xuất hiện ở các dòng chịu muối [117]. Mối tương quan giữa ABA, tính chịu muối và sự tổng hợp các protein đặc biệt là vấn đề đang cần tiếp tục nghiên cứu.

Vấn đề chọn dòng chịu hạn, chịu nhiệt độ thấp được thông báo là rất thành công trên cây lúa [1]. Việc tiến hành chọn lọc các dòng lúa chịu nóng, chịu phèn cũng đã bước đầu được nghiên cứu bởi Nguyễn Thị Tâm và đtg (1999) [28], Nguyễn Thị Vinh và đtg (1995) [38].

Để làm tăng tần số đột biến của các cây trồng, nghiên cứu phối hợp tác nhân đột biến vào quá trình nuôi cấy *in vitro* đã được công bố. Lê Xuân Đắc và đtg (2006) đã tạo được dòng lúa TĐB06 thấp cây, ngăn ngày từ giống lúa Tám xoan. Dòng TĐB06 đã được được khảo nghiệm trong hệ thống khảo nghiệm Quốc gia và được đánh giá là dòng có triển vọng [6].

Theo hướng cải thiện tính chịu hạn, Lê Thị Bích Thủy và đtg (2008) đã xử lý mô sẹo lúa bằng tia gamma trước khi tái sinh cây, sau đó thu hạt của các dòng cây tái sinh và sàng lọc bằng PEG cùng với chỉ thị phân tử SSR và STS liên quan đến hạn. Nhóm tác giả đã thu được ba dòng triển vọng đề nghị tiếp tục đánh giá và giới thiệu khảo nghiệm giống chịu hạn [34].

Như vậy, việc nghiên cứu xây dựng và hoàn thiện các hệ thống nuôi cấy mô tế bào thực vật nhằm nâng cao khả năng chống chịu với các điều kiện bất lợi của môi trường được nhiều nhà khoa học quan tâm chú ý. Trong đó, nhiều dòng cây xanh tạo ra có khả năng sinh trưởng phát triển bình thường như cây lúa, cây lạc... Chọn dòng theo hướng chống chịu bất lợi môi trường đã rất thành công trên một số đối tượng như lúa, thuốc lá... Những thành tựu thu được là gợi ý để chúng tôi lựa chọn nghiên cứu nâng cao khả năng chống chịu hạn trên cây lạc.

1.3. PHÂN TÍCH, ĐÁNH GIÁ CÁC DÒNG CHỌN LỌC CÓ NGUỒN GỐC TỪ NUÔI CÂY MÔ SẸO

1.3.1. Đánh giá khả năng chịu mất nước của mô, tế bào thực vật

Xử lý gây mất nước của mô hay tế bào thực vật thường sử dụng luồng khí vô trùng của box cấy hoặc dùng các chất làm thay đổi áp suất thẩm thấu của tế bào. Đánh giá khả năng chịu mất nước của mô sẹo thông qua việc xác định độ mất nước và khả năng chịu mất nước. Kết quả đánh giá cho phép xác định ngưỡng chọn lọc dòng tế bào, đây là hướng khá hiệu quả trong nghiên cứu ứng dụng công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật để nâng cao khả năng chịu hạn của cây trồng.

Matheka và đtg (2008) dùng PEG 6000 nồng độ 20% để xử lý mô sẹo ngô, sau đó chọn dòng tế bào sống sót trên môi trường chứa manitol [96]. Với mục tiêu tạo vật liệu khởi đầu phục vụ chọn dòng chịu hạn ở cây đậu xanh, Chu Hoàng Mậu và đtg (2010) đã tạo được mô sẹo từ phôi mầm của hạt đậu xanh trên môi trường MS cơ bản có bổ sung 2,4-D 10mg/l. Sau 10 ngày nuôi cấy, các mô sẹo được thổi khô và nuôi phục hồi. Đánh giá tỷ lệ mô sống sót, mô sống sót tái sinh cây, nhóm tác giả xác định được ngưỡng xử lý thổi khô để chọn dòng chịu hạn của hai giống đậu xanh khác nhau là 5 giờ (ĐVN6) và 7 giờ (ĐVN5) [15].

Nghiên cứu khả năng chịu mất nước ở mức độ mô sẹo của lạc chủ yếu mới dừng lại ở việc đánh giá độ mất nước, tỷ lệ sống sót và khả năng tái sinh cây ở các ngưỡng xử lý khác nhau. Với độ mất nước từ 80,40% đến 86,49% mô sẹo của nhiều giống lạc được đánh giá là có khả năng tái sinh. Tuy nhiên, khả năng tái sinh khác nhau tùy thuộc vào giống và thời gian chịu thổi khô [25]. Do vậy, các cây tái sinh được tạo thành dòng hoàn chỉnh sẽ là nguồn vật liệu khởi đầu có giá trị trong chọn dòng.

1.3.2. Đánh giá khả năng chịu hạn ở giai đoạn hạt nảy mầm và giai đoạn cây non

Trên cơ sở nguồn vật liệu khởi đầu đã có, nghiên cứu đánh giá các dòng chọn lọc chính là quá trình phân tích, tìm tòi nhằm chọn ra các dòng mang tính trạng mong muốn để bồi dưỡng tạo giống mới. Quá trình đánh giá các dòng chọn lọc giống như quá trình chọn giống trên cây nguyên vẹn. Có nhiều cách tiếp cận để giải quyết vấn đề này, tuy nhiên mô hình chung là từ kết quả thí nghiệm, nhận xét hiện tượng và rút ra kết luận mang tính quy luật. Tính đa dạng di truyền của sinh vật biểu hiện ở sự đa dạng các tính trạng về hình thái, và các đặc điểm sinh lý, hoá sinh; về khả năng chống chịu các điều kiện bất lợi của ngoại cảnh, về sự biến động hàm lượng các chất trong tế bào... Khi nghiên cứu chọn giống cây trồng người ta thường quan tâm đến các tính trạng có thể cân, đong, đo, đếm được (các tính trạng số lượng). Nghiên cứu các tính trạng số lượng cho phép xác định mối liên quan đến năng suất sinh vật, đến chất lượng sản phẩm. Sự di truyền các tính trạng số lượng tuân thủ các nguyên tắc cơ bản của quy luật di truyền [16]. Hai giai đoạn sinh trưởng của thực vật được cho là mẫn cảm với hạn là giai đoạn hạt nảy mầm và giai đoạn cây non. Những giai đoạn này thường được sử dụng để đánh giá khả năng chống chịu với yếu tố bất lợi của môi trường.

Khả năng chịu hạn ở giai đoạn hạt nảy mầm của cây được đánh giá chủ yếu trên cơ sở sự biến động của các chỉ tiêu hóa sinh. Trong giai đoạn hạt nảy mầm, nhiều enzyme thủy phân được tổng hợp mạnh để phân giải chất dự trữ cung cấp dinh dưỡng cho cây. Hoạt độ của một số enzyme tăng là minh chứng cho tính chống chịu của cây trồng có nguồn gốc từ mô sẹo bị xử lý được cải thiện. Nghiên cứu của Nguyễn Thị Tâm và Lê Trần Bình (2003) nhận thấy, có mối tương quan thuận chặt chẽ về sự biến động của hàm lượng đường tan và hoạt độ của α -amylase ở các dòng lúa chọn lọc từ mô sẹo chịu nóng [27].

Trong đó, tăng áp suất thẩm thấu của tế bào thông qua các phân tử đường tan sẽ làm tăng khả năng chống chịu của cây.

Ở giai đoạn cây non, khả năng chịu hạn được đánh giá thông qua xác định các chỉ tiêu sinh lý, hóa sinh. Đến giai đoạn cây non đặc điểm hình thái của cây đã có thể quan sát được. Sự biến động hàm lượng các chất vẫn diễn ra bình thường, theo một quy luật nhất định.

Quan sát sự phát triển các đặc điểm quan trọng ở cây khoai tây như: chiều dài và trọng lượng rễ, chiều dài và trọng lượng chồi, tốc độ phát triển của cây con ở điều kiện gây hạn bằng PEG 6000 trong ống nghiệm và cây con chọn lọc trồng ngoài đồng ruộng, kết quả nghiên cứu khẳng định, có thể lựa chọn khả năng kháng hạn của các dòng khoai tây chọn lọc ở các mức độ thiếu hụt nước khác nhau thông qua quan sát kiểu hình [83].

Nghiên cứu của Nguyễn Thị Tâm và đtg (2009) về việc đánh giá đặc điểm hóa sinh hạt của các dòng lúa có nguồn gốc từ mô sẹo chịu mất nước ở thể hệ R4 so với giống gốc, các chỉ tiêu phân tích gồm protein, lipid, đường đều có sự gia tăng trong hạt, kết quả nghiên cứu khẳng định các dòng chọn lọc được cải thiện về thành phần hóa sinh hạt [23]. Trương Thị Bích Phượng và đtg (2005) tiến hành phân tích thành phần protein trong hạt của 3 dòng lúa chọn lọc có nguồn gốc từ mô sẹo bị xử lý ABA trên môi trường bổ sung 15% manitol, nhóm tác giả nhận thấy tất cả các dòng chọn lọc đều tăng về số lượng hoặc hàm lượng tiểu phân protein so với giống gốc [19]. Phân tích đa hình protein bằng kỹ thuật điện di hai chiều của Hoàng Tấn Quảng và đtg (2008) cũng nhận được kết quả tương tự [20]. Sự đa hình protein trong hạt là do biểu hiện của gen liên quan đến hạn trong các dòng chọn lọc *in vitro* được hoạt hóa khi gặp điều kiện bất lợi môi trường làm xuất hiện protein mới. Rất có thể đó là kết quả của gen tổng hợp protein dự trữ được biến đổi nhờ quá trình nuôi

cây và chọn lọc đúng biến dị soma. Những thay đổi làm xuất hiện những tính trạng mới là cơ sở chọn tạo dòng mang các tính trạng mong muốn.

Phân tích sự biến động hàm lượng các chất trong điều kiện stress khác nhau để chọn lọc dòng mang tính trạng mong muốn. Các dòng chọn lọc tạo ra bằng kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật có sự tăng hàm lượng proline được xác định là chỉ thị liên quan đến khả năng chịu hạn của lúa. Vì vậy, có thể căn cứ vào hàm lượng proline trong cây để lựa chọn dòng có khả năng chịu hạn [34].

1.3.3. Kỹ thuật RAPD trong đánh giá hệ gen của các dòng chọn lọc

Kỹ thuật RAPD được William và dtg (1990) sử dụng để phát hiện hiện tượng đa hình DNA nhờ sự nhân bản ngẫu nhiên của các mồi có trình tự ngắn, độ dài khoảng 9-12 nucleotide, có nhiệt độ gắn mồi thấp (35°C - 37°C). Sản phẩm của phản ứng được phân tách bằng phương pháp điện di trên gel agarose, nhuộm gel bằng ethyidium bromide, sau đó quan sát và phân tích kết quả nhờ ánh sáng của tia cực tím (UV-ultraviolet) [129]. Phân tích tính đa hình của DNA dựa trên sự xuất hiện hay không xuất hiện các phân đoạn có cùng kích thước được khuếch đại từ hệ gen nhờ sự thay đổi các điểm gắn của mồi... Sử dụng kỹ thuật RAPD để phân tích hệ gen có đặc điểm là đơn giản, nhanh chóng, không cần biết những thông tin về trình tự. Vì vậy, nhiều nghiên cứu đã cho thấy sử dụng RAPD khá hiệu quả trong phân tích quần thể, xác lập nguồn gốc loài, lập bản đồ di truyền và đặc biệt so sánh hệ gen của các dòng chọn lọc thu được làm cơ sở để lựa chọn dòng triển vọng [54], [55], [72], [107].

Nguyễn Đức Hoàng và dtg (2008) sử dụng kỹ thuật RAPD với 10 mồi ngẫu nhiên nhận thấy hệ gen của các dòng lúa chọn lọc thế hệ R_3 có nguồn gốc từ mô sẹo chịu mất nước có sự thay đổi so với giống gốc, mức khác biệt di truyền là 10% [9]. Với các dòng lựa chọn lọc, kết quả phân tích RAPD

cũng thu được sự khác biệt của dòng chọn lọc với giống gốc trong khoảng 3,18- 20,55% [24]. Các kết quả nghiên cứu đều chứng tỏ có sự biến đổi vật chất di truyền trong quá trình nuôi cấy *in vitro* của các dòng chọn lọc so với giống gốc .

Chỉ thị RAPD được đánh giá là có giá trị trong việc phát hiện đột biến khi nuôi cấy chồi cây đậu tương, mặc dù kết quả nghiên cứu thu được số mỗi có tỷ lệ đa hình không cao song tác giả cũng khẳng định đây là công cụ hữu ích trong việc phát hiện các đột biến khi nuôi cấy phôi bằng *in vitro* trên cây đậu tương [73].

Mức độ xuất hiện không giống nhau về tỷ lệ các băng đa hình, về mức độ biến dị trong hệ gen bằng kỹ thuật RAPD, các kết quả nghiên cứu trong chọn dòng đều khẳng định sự sai khác trong phân tích là căn cứ để tạo giống mới. Tuy nhiên, nghiên cứu của Lê Thị Bích Thủy và đtg (2008) khẳng định, không phải tất cả các dòng chịu chiếu xạ đều tạo ra sự khác biệt trong hệ gen, từ kết quả phân tích RAPD tác giả vẫn nhận thấy nhiều dòng lúa giống nhau hoàn toàn, giống với đối chứng và giống với mô không chiếu xạ. Sự phân ly do đột biến ở lúa không theo một quy luật nhất định [34].

Bên cạnh việc xác định sự thay đổi trong hệ gen, một số nghiên cứu cũng chỉ ra việc lựa chọn kỹ thuật RAPD cũng rất hiệu quả với việc liên kết với các gen có giá trị của quá trình chọn giống. Chỉ thị RAPD được công bố là có liên quan đến gen kháng bệnh phủ nấm mốc trắng ở đậu, cây mang gen kháng bệnh được chọn lọc ở thế hệ F2 cho kết quả đa hình giữa cây bố và cây mẹ [62]. Kết quả phân tích và khẳng định, chỉ thị RAPD liên kết với gen kiểm soát tính kháng độc ở cây nghệ [121]. Trên cây lạc, nghiên cứu của Mondal và đtg (2007) cho biết chỉ thị RAPD có mối liên kết với gen kháng bệnh gỉ sắt [99] ... Tuy nhiên, việc tìm chỉ thị liên quan đến tính chịu hạn của thực vật nói chung và cây lạc nói riêng còn là vấn đề cần được thảo luận.

1.4. GEN LIÊN QUAN ĐẾN TÍNH CHỊU HẠN Ở CÂY LẠC

Tính chịu hạn của thực vật là tính trạng do nhiều gen quyết định. Xu hướng tìm kiếm gen chịu hạn là quan tâm nghiên cứu của nhiều tác giả. Tuy nhiên, đến nay vẫn chưa tìm thấy gen đặc hiệu nào quyết định tính chịu hạn của thực vật mà chỉ có các gen liên quan đến khả năng chịu hạn. Có thể chia các gen liên quan đến tính chịu hạn làm hai nhóm: Các gen liên quan đến khả năng chịu hạn của thực vật và nhóm gen mã hóa protein điều khiển hoạt động phiên mã của các gen liên quan đến tính chịu hạn.

1.4.1. Các gen liên quan đến khả năng chịu hạn của cây lạc

Các gen liên quan đến khả năng chịu hạn của thực vật có thể chia thành các nhóm: (i) Các gen tham gia vào quá trình bảo vệ thành tế bào; (ii) Các gen tham gia vào quá trình tổng hợp các chất điều hòa áp suất thẩm thấu và (iii) Các gen liên quan đến sự phát triển bộ rễ.

Gen *LEA* là một trong những nhóm gen liên quan tới sự mất nước của thực vật. Bình thường, sản phẩm của gen *LEA* được tạo ra với lượng lớn trong giai đoạn muộn của quá trình hình thành phôi. Khi tế bào bị mất nước protein *LEA* được tổng hợp nhiều hơn, mức độ phiên mã của *LEA* được điều khiển bởi ABA. Biểu hiện mạnh của gen *LEA* sẽ làm giảm độ mất nước và tăng áp suất thẩm thấu trong tế bào [51], [67]. Nghiên cứu của Su và đtg (2010) trên giống lạc *Luhua14* phát hiện, có ít nhất 8 loại gen *LEA*. Các gen *LEA* của lạc ký hiệu *AhLEA* bao gồm *AhLEA8-1*, *AhLEA7-1*, *AhLEA6-2*, *AhLEA6-1*, *AhLEA4-2*, *AhLEA4-1*, *AhLEA1-3*, *AhLEA1-1*. Tám gen *AhLEA* có kích thước dao động trong khoảng 299-575bp [122].

Nhóm gen *P5CS* mã hóa tổng hợp pyrroline 5 carboxylate synthetase. Enzyme P5CS tham gia vào quá trình tổng hợp proline, biểu hiện của gen

P5CS mạnh sẽ làm tăng hàm lượng proline, có vai trò tăng áp suất thẩm thấu của tế bào và cây trong điều kiện hạn hán....

Gen *NCED* mã hóa tổng hợp 9-cis epoxycarotenoid dioxygenase. Theo nghiên cứu của Guerrini và đtg (2005), sự bất lợi của điều kiện về hạn, muối làm cho gen điều khiển tổng hợp 9-cis epoxycarotenoid dioxygenase biểu hiện mạnh hơn. Hoạt động của 9-cis epoxycarotenoid dioxygenase sẽ biến đổi neoxathin thành xathoxin, đây chính là giai đoạn trước khi hình thành ABA. Do đó, hoạt động của *NCED* được xác nhận có mối liên quan với khả năng chống chịu của thực vật [69]. Gen *AhNCED* của lạc được phân lập bởi Wan và đtg (2005) có kích thước 2486bp, mã hóa một protein gồm 610 amino acid, với trọng lượng phân tử là 66,86 kDa [128].

Gen *PLD* mã hóa phospholipase D, hoạt động của phospholipase D mạnh sẽ tạo một phân tử phospholipid và một gốc chứa nhóm hydroxyl tự do, hoạt động của các *PLD* được khẳng định có liên quan đến hạn [59], [74], [126]. Tách dòng và xác định trình tự gen *PLD* ở hạt lạc, nhóm nghiên cứu của Nakazawa (2006) đã phát hiện trong hạt lạc có hai gen *PLD*, ký hiệu là *AhPLD1* và *AhPLD2*. Trong đó, *AhPLD1* mã hóa phospholipase D1 gồm 807 amino acid, và *AhPLD2* mã hóa phospholipase D2 gồm 794 amino acid [104]. Cơ chất của các phospholipase là phosphatidylcholine, hoạt động tối thích với môi trường có độ pH=5. Trong điều kiện bị hạn, cDNA mã hóa phospholipase D α của lạc được phân lập có kích thước 556bp [59].

1.4.2. Nhóm gen mã hóa protein điều khiển hoạt động phiên mã của các gen chịu hạn

Các gen mã hóa protein điều khiển phiên mã có khả năng hoạt hóa hoặc ức chế biểu hiện của các gen liên quan đến tính chịu hạn thông qua việc bám vào trật tự DNA điều khiển (*cis acting element*) trên vùng khởi động gen (promoter) và tương tác với RNA polymerase tạo thành phức hợp khởi đầu

quá trình phiên mã các gen liên quan đến tính chịu hạn. Theo các nghiên cứu về nhân tố phiên mã của một số tác giả đã được công bố trên Ngân hàng gen quốc tế, có nhiều yếu tố khởi đầu phiên mã điều khiển tính chịu hạn của thực vật như: DREB, bZIP, MYB....[79], [113], [116].

Gen *DREB* (dehydration responsive element binding) được tách ra từ lá, hoa, thân và rễ của lạc đều có kích thước 687bp mã hóa phân tử protein gồm 228 amino acid [86].

Gen cystatin ở thực vật mã hóa protein cystatin ức chế hoạt động của cysteine proteinase. Trong những năm gần đây, cystatin được bàn luận nhiều bởi mối liên quan của nó với tính chống chịu yếu tố bất lợi của ngoại cảnh, bao gồm các yếu tố về hạn, lạnh, mặn ... [93], [125], [132].

1.5. CYSTATIN VÀ VAI TRÒ CỦA CYSTATIN Ở THỰC VẬT

Cystatin (CYS) là một dạng protein ức chế hoạt động của cysteine proteinase (cysteine proteinase inhibitor-CPI). Cystatin phân bố rộng rãi ở động vật, thực vật và vi sinh vật cho thấy đây là một nhóm chất đóng vai trò quan trọng với sự tồn tại, sinh trưởng và phát triển của sinh vật [106]. Trong những năm gần đây, nhiều công trình nghiên cứu công bố về gen cystatin đã chỉ ra rằng, cystatin là sản phẩm của một họ gen, tuy nhiên, những hiểu biết về gen cystatin ở thực vật còn nhiều hạn chế [46], [89], [92].

1.5.1. Đặc điểm cấu tạo và phân loại cystatin

Phân tích cystatin ở các giới sinh vật, kết quả nghiên cứu cho thấy các loại protein cystatin khác nhau có mối quan hệ với nhau về cấu trúc bậc 1, đặc biệt là những trình tự amino acid đặc trưng trong việc ức chế hoạt động của cysteine proteinase. Sự sai khác về kích thước, khối lượng của phân tử protein, về số lượng và vị trí các liên kết disulphide... là căn cứ để phân loại cystatin thành bốn họ: stefin, cystatin, kininogen và phytocystatin.

Stefin

Stefin là họ CYS thứ nhất, gồm những protein có khối lượng phân tử khoảng 11 kDa. Chuỗi polypeptid chứa khoảng 100 amino acid, không có liên kết disulphide và các nhóm cacbonhydrat liên kết trong thành phần cấu tạo. Vùng hoạt động của stefin là vị trí G ở gần đầu NH₂ và 5 amino acid trong trung tâm phản ứng [115].

Cystatin

Cystatin là họ thứ hai, có khoảng 120-126 amino acid, khối lượng khoảng 13,4-14,4 kDa. Họ cystatin thứ 2 có 2-3 liên kết disulphide và đa số là không glycosyl hoá. Tất cả cystatin họ 2 có trình tự tripeptide bảo thủ là phenylalanine- alanine-valine (FAV) ở gần đầu NH₂ và 1 dipeptide bảo thủ ở gần đầu COOH là phenylalanine- tyrosine (PW). Các trình tự bảo thủ được ghi nhận là rất quan trọng trong việc kết hợp với enzyme đích [124].

Kininogen

Kininogen là họ CYS thứ ba, bao gồm những glycoprotein có kích thước lớn, khối lượng lớn. Khối lượng của kininogen khoảng 60-120 kDa. Các kininogen đóng một vai trò quan trọng trong quá trình đông máu [103].

Đa số cystatin của họ thứ nhất và họ thứ ba giống nhau ở trình tự pentapeptide trong trung tâm phản ứng, vùng bảo thủ là glutamine-valine-valine-alanine-glycine (QVVAG). Các thành viên của họ thứ 2 có sự thay thế ở amino acid ở vị trí thứ 2 và thứ 4 của chuỗi, vì vậy có trình tự pentapeptide tương đồng là QxVxG (trong đó x, được thay thế bằng một amino acid bất kỳ) [45].

Phytocystatin

Phytocystatin (phycys) là họ CYS thứ tư. Nhóm phytocystatin là các cystatin ở thực vật, được tạo thành một phân họ độc lập trên cây phát sinh loài

của siêu họ CYS [90]. Điểm chung của các phycys là tất cả đều chứa thêm so với cystatin của các sinh vật khác một trình tự với những amino acid bảo thủ [LVI]- [AGT]- [RKE]- [FY]- [AS] – [VI] ở vùng xoắn alpha đầu NH₂ của chuỗi polypeptide. Trong đó, các vị trí trong ngoặc ([]) có thể thay thế cho nhau [125].

Chất gây ức chế cysteine proteinase của thực vật được phân lập từ nhiều loài, kết quả thu được cho thấy chúng có kích thước khác nhau, thường dao động từ 12 kDa đến 85 kDa. Cystatin thực vật có thể chia thành hai nhóm dựa theo cấu trúc phân tử protein và trọng lượng của chúng.

Nhóm thứ nhất được tạo thành bởi các phytocystatin chứa một miền CYS, có kích thước 12-16 kDa, không có cầu disulphide và vùng glycosilation giả định, gen mã hoá chúng không có intron hoặc có 1 intron ở đoạn giữa LARFAV và QxVxG. Phytocystatin nhóm I được nghiên cứu kỹ và sớm nhất là cystatin ở lúa, ký hiệu OCI [40].

```
mssdggpvl g gvepvgnend lhl vdl arfa vtehnkkans
ll efekl vsv kqqvvgvtly yftievkegd akkl yeakvw
ekpwmdfkel qefkpvdasana
```

Hình 1.1. Trình tự 102 amino acid của OCI

(mã số trên GenBank: AAA33903) [143]

Oryzacystatin I tương đồng với cystatin lòng trắng trứng, kết quả phân tích cho thấy OCI thiếu cầu nối disulphide, khối lượng vào khoảng 11,5 kDa với 102 amino acid. Vùng CYS từ vị trí 20 đến 95, trong đó vùng bảo thủ của OCI (mô tả trên hình 1.1 là các vị trí in đậm) gồm glycine ở vị trí số 5 (G⁵), năm peptide (pentapeptide) ở vùng trung tâm hoạt động kéo dài từ vị trí 53 đến 57 là glutamine⁵³-valine⁵⁴-valine⁵⁵-alanine⁵⁶-glycine⁵⁷ và proline⁸³-

tryptophan⁸⁴ (PW). Trình tự đặc trưng của họ (LARFAV) kéo dài từ vị trí 26 đến 31. Nhóm phytolectin I cũng là nhóm chủ yếu của thực vật [40].

Nhóm phytolectin thứ hai sở hữu nhiều miền cystatin (multicystatin), với những vùng bảo thủ lặp đi lặp lại. Khối lượng phân tử của phytolectin nhóm 2 lớn, dao động trong khoảng 80-120 kDa. Gen mã hoá chúng có 3 intron, chuỗi polipeptide có một phần mở rộng đầu COOH [89], [92].

Phân tích PMC (Potato MultiCystatin) là cystatin đa miền được phân lập từ củ khoai tây cho thấy, khối lượng của PMC khoảng 85 kDa [64]. PMC có 8 vùng của cystatin, các vùng gắn đồng thời với nhiều cysteine proteinase [105].

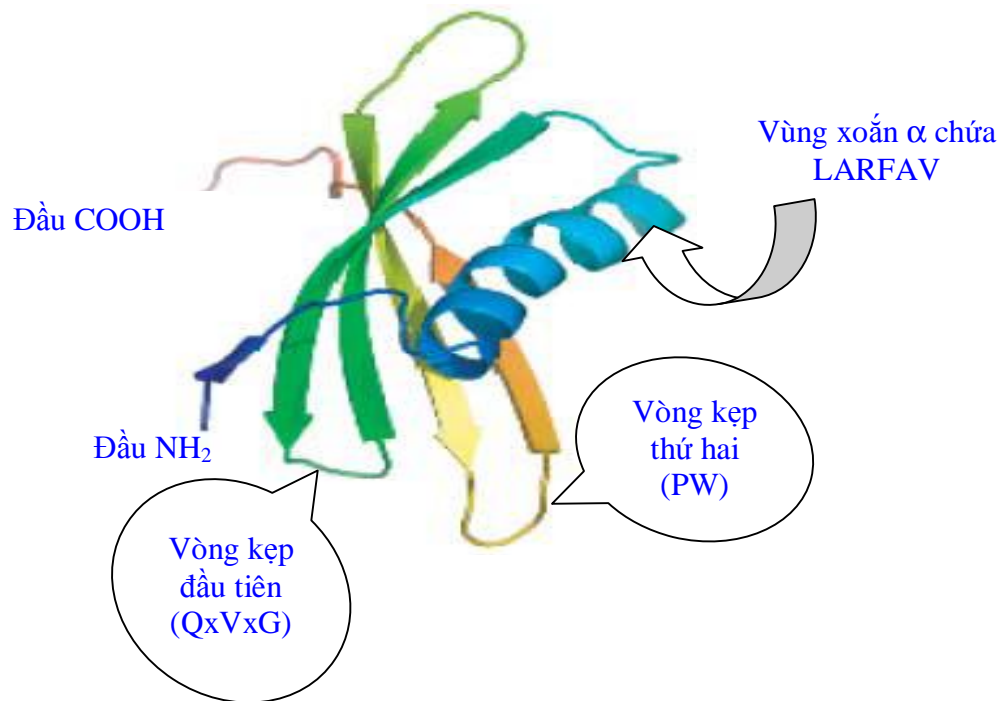
Kết quả phân tích về cấu trúc của cystatin thực vật cho thấy, đây thực sự là nhóm chất phức tạp, cần thiết có những nghiên cứu sâu và khuyến cáo để có cái nhìn sâu sắc về vai trò của cystatin trong cơ thể sống.

1.5.2. Cấu trúc không gian và cơ chế ức chế của cystatin

1.5.2.1. Cấu trúc không gian của cystatin

Cấu trúc không gian cơ bản của cystatin thực vật bao gồm 4 đến 5 phiến gấp nếp β nằm song song và ngược chiều nhau. Các phiến β liên kết với xoắn α vùng đầu NH_2 .

Cystatin thực vật mô tả trên hình 1.2 cho thấy, vị trí cơ bản của các vùng bảo thủ và hoạt động gồm: (i) Một đoạn thò ra ở gần đầu NH_2 , chứa trình tự G (ii) vòng xoắn α chứa trình tự đặc trưng cho cystatin thực vật là LARFAV (iii) hai vòng kẹp tóc gắn vào trung tâm hoạt động của cysteine proteinase, trong đó: vòng gần đầu NH_2 chứa trình tự bảo thủ QxVxG, vòng thứ 2 gần đầu COOH chứa PW.



Hình 1.2. Cấu trúc không gian ba chiều của cystatin thực vật
(theo Girard và đtg, 2007) [66]

1.5.2.2. Cysteine proteinase

Đối tượng ức chế của cystatin là cysteine proteinase. Đây là nhóm enzyme thuộc phân lớp thứ 3, theo cách phân loại của hiệp hội Hoá sinh quốc tế (thường kí hiệu: EC 3.4.22-). Cysteine proteinase xúc tác phân cắt chuỗi peptide ở vị trí bên trong mạch polypeptide (endopeptidyl hydrolase). Trung tâm hoạt động của enzyme này có chứa nhóm sunfuhydryl (hay còn gọi là thiol, nhóm SH), đây là nhóm có khả năng phản ứng cao. Nhóm sunfuhydryl tham gia vào nhiều hoạt động biến đổi hóa học. Ví dụ như, nhóm SH tham gia vào sự ion hóa, acyl hóa, phosphoryl hóa, oxy hóa, anky hóa... và người ta cũng thấy rằng, hàng loạt các enzyme bị ức chế khi nhóm SH chức năng của chúng bị khóa. Quá trình nghiên cứu không rõ bản chất của cơ chất [45].

Quá trình tổng hợp cysteine proteinase xảy ra ở polysome trên lưới nội chất (RER- rough endoplasmic reticulum), sau đó peptide tín hiệu bị loại bỏ, nhưng enzyme chưa có hoạt tính. Cysteine proteinase tiếp tục được vận chuyển đến không bào (vacuole) dự trữ, sau đó loại bỏ trình tự tín hiệu ở đầu NH₂, mới trở thành enzyme có hoạt tính [102]. Vì vậy, quá trình tổng hợp cysteine proteinase thành dạng hoạt động là một quá trình phức tạp.

Trong các loại cysteine proteinase thì họ papain được nghiên cứu kỹ nhất. Theo Fischer và đtg (2000), papain được sinh ra ở dạng chưa hoạt động hoặc ít hoạt động (zymogen), có kích thước từ 40-50 kDa. Quá trình biến đổi phân tử sau dịch mã làm cho các phân tử cysteine proteinase mới sinh bị cắt hạn chế khoảng 3 đến 4 lần mới trở thành cysteine proteinase hoạt động. Kích thước của cysteine proteinase trưởng thành khoảng 22-35kDa. Đa số các cysteine proteinase có pH cực thuận ở vùng axit [61].

Trong cơ thể sống, cysteine proteinase thực hiện nhiều chức năng quan trọng như: trưởng thành protein, làm mới protein để phù hợp với những thay đổi bên ngoài và loại bỏ protein bất thường, protein nhỡ gấp cuộn [68]. Trong các cây họ đậu, cysteine proteinase dạng papain hiện diện như proteinase chủ yếu của quá trình thủy phân protein dự trữ.

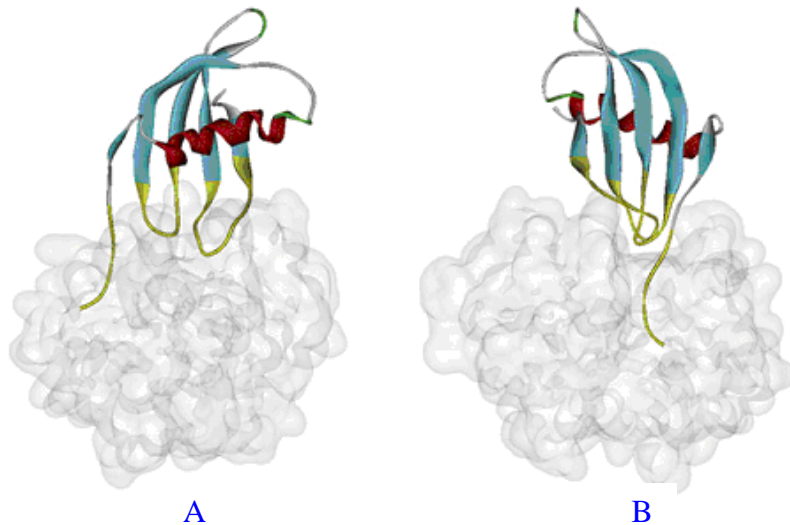
Đa số cystatin thực vật ức chế hai loại cysteine proteinase thuộc nhóm papain và legumain. Nhóm papain (nhóm C1) bị ức chế bởi các phân tử cystatin có khối lượng phân tử 12-16kDa, nhóm legumain (nhóm C13) bị ức chế bởi cystatin 23 kDa [92]. Gây hạn ở giai đoạn cây lúa mỳ non với mức thâm hụt nước khoảng 60%, kết quả phân tích trong điều kiện hạn hán, hoạt động của cysteine proteinase giảm biểu hiện ở các giống có khả năng chịu hạn, tuy nhiên nó lại không thay đổi hoặc là tăng ở các giống chịu hạn kém. Kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng hoạt động phân giải protein thấp hơn và giảm

sự biểu hiện của cysteine proteinase trong giai đoạn đầu thiếu hụt nước có thể coi là một chỉ số để đánh giá khả năng chịu hạn của lúa mỳ [118].

1.5.2.3. Cơ chế ức chế của cystatin

Kết quả nghiên cứu trong báo cáo của Merops (2010), Rawlings và đtg (2008) chỉ ra rằng, cystatin đóng vai trò như cơ chất để xâm nhập vào trung tâm hoạt động của enzyme và ngăn chặn việc đi vào của các cơ chất protein khác [97], [109].

Các thành phần trong cấu trúc không gian ba chiều hình thành nên dạng hình chạc ba được cắm vào trong trung tâm hoạt động của enzyme đích gồm 2 vòng lặp (kí hiệu là L1, L2) và 1 vùng ở đầu NH₂.



Hình 1.3. Mô hình cấu trúc ức chế hoạt động của oryzacystatin

Theo Nakazawa và đtg (2000), mô hình cấu trúc ức chế hoạt động của oryzacystatin được mô tả (hình 1.3) gồm: phía trước (hình A) và phía sau (hình B) oryzacystatin tương tác với enzyme papain (màu xám trắng). Các amino acid của cystatin tương tác với papain là: vùng đầu NH₂ từ glycine vị trí số 5 tới glycine vị trí số 11, glutamine vị trí số 53 tới tyrosine vị trí số 60

cho vòng ức chế đầu tiên và tryptophan vị trí số 80 đến glutamine vị trí số 91 cho vòng ức chế thứ hai (màu vàng) [104].

Vị trí các vùng bảo thủ của các cystatin khác nhau là khác nhau, tuy nhiên thường gặp trong các cystatin là: vị trí glycine- vùng đầu NH₂, vòng lặp thứ nhất là đoạn bảo thủ QxVxG, nằm trong vùng trung tâm của cystatin và vòng lặp thứ 2 là vị trí W (tryptophan) ở vùng đầu COOH. Phần protein còn lại không xâm nhập vào khe hoạt hóa, nhưng lại đóng góp rất đáng kể tới quá trình liên kết và ảnh hưởng mạnh tới tính đặc hiệu của cystatin với cysteine proteinase [92].

1.5.3. Chức năng của cystatin

Kết quả dự đoán về phản ứng của tế bào khi bị thiếu hụt nước, Bray (1993) đã đề cập sản phẩm của các gen tham gia duy trì chức năng tế bào trong suốt giai đoạn mất nước, đó là nhóm chất ức chế hoạt động của protease (protease inhibitor) [51]. Khi gen này hoạt động, sản phẩm tạo thành sẽ tham gia vào bảo vệ các enzyme, hạn chế sự phân giải các chất do đó bảo vệ các cấu trúc trong tế bào. Nghiên cứu của chúng tôi về cystatin đã gợi ý rằng, phải chăng enzyme bị ức chế đó là cysteine proteinase và chất ức chế của nó chính là cystatin.

Diop và đtg (2004) đã phân lập trình tự gen *VuC1* từ mRNA (cDNA) mã hoá cystatin từ lá cây đậu cô ve (*Vigna unguiculata* (L.) Walp.). Các protein *VuC1* tái tổ hợp (r*VuC1*) được biểu hiện từ cDNA là một chất ức chế hiệu quả hoạt động của papain. Sự biểu hiện của gen *VuC1* trong tế bào phản ứng với tác động của các yếu tố bất lợi phi sinh học (hạn hán, ABA ngoại sinh) được phân tích bởi phương pháp Northern blot và Western blot. Kết quả cho thấy, trong các mô lá của cây đậu cô ve thuộc hai giống khác nhau về khả năng chịu hạn, các yếu tố bất lợi phi sinh học đã tạo ra sự tăng tích tụ các

polypeptide VuC1. Sự khác nhau về mật độ tích tụ cystatin tương ứng với mức độ chịu đựng của cây đậu cô ve [57].

Việc nghiên cứu gen cystatin không những giải quyết mối liên quan của gen với tính chống chịu hạn mà còn liên quan đến khả năng chống vi sinh vật, chống côn trùng gây bệnh đối với cây trồng [57], [70], [125], [132].

1.5.4. Gen mã hóa cystatin

1.5.4.1. Gen mã hóa cystatin ở thực vật

Gen mã hoá cystatin thực vật được phân lập đầu tiên trên cây lúa, gọi là oryzacystatin I, ký hiệu là *OCI*. Kết quả tách chiết *OCI* từ mRNA của lúa được đoạn mã hóa gồm 309 bp, mã hóa phân tử protein gồm 102 amino acid [40]. Gen cystatin thứ 2 phân lập từ hệ gen lúa là oryzacystatin II do Kondo và đtg (1991). *OCII* là một phân tử có kích thước khoảng gần 2,5 kb, chứa 1534 bp. *OCII* có 3 exon và 2 intron, đoạn mã hóa gồm 321 nucleotide mã hóa phân tử cystatin gồm 106 amino acid (Mã số: X57658) [140].

Kết quả nghiên cứu ở ngô cho thấy, có 10 gen cystatin của ngô, các gen kí hiệu là *CC*, kí hiệu các gen theo thứ tự từ 1 đến 10, tương ứng là *CC1*, *CC2*, *CC3*, *CC4*, *CC5*, *CC6*, *CC7*, *CC8*, *CC9* và *CC10* [93]. Trong 10 gen cystatin ngô, có 9 gen được phân lập từ mRNA, chỉ có 1 gen *CC1* phân lập từ DNA. Kích thước gen *CC1* chứa 2024bp, trong đó có 3 exon và 2 intron, 3 exon mã hóa phân tử protein dài 134 amino acid (Mã số: D63342) [141].

Trên cây đậu xanh, tác giả Chu Hoàng Mậu và đtg (2008) phân lập gen cystatin từ DNA của các giống khác nhau, đều nhận được gen có kích thước 1115 nucleotide, chứa 2 exon và 1 intron. Đoạn mã hóa cystatin đậu xanh dài 267 nucleotide mã hóa phân tử protein dài 88 amino acid. So sánh trình tự gen này với các trình tự gen cystatin có khả năng chịu hạn khác nhau trên ngân

hàng gen quốc tế, nhóm tác giả khẳng định không có sự sai khác về trình tự gen cystatin [17].

Cũng thuộc nhóm cây đậu đỗ, gen cystatin ở cây đậu tương khá lớn, kích thước mà nhóm tác giả Misaka (2000) phân lập chứa tới 5863 nucleotide, trên đó có 4 exon và 3 intron [142].

So với gen cystatin phân lập từ DNA hệ gen, chúng tôi nhận thấy gen cystatin phân lập từ mRNA chiếm số lượng lớn. Cystatin trong đại mạch (*Hordeum vulgare*) do bảy gen mã hoá, các gen được phân lập từ mRNA ký hiệu từ *HvCPI₁* đến *HvCPI₇* [91]. Tuy nhiên căn cứ vào trình tự protein suy diễn, Abraham và đtg (2006) cho biết chỉ có 1 trong 7 trình tự cystatin là liên quan đến chất ức chế cysteine proteinase [41].

Trong hạt lúa mì có ít nhất 4 gen cystatin, gen cystatin của lúa mì ký hiệu là *WC1*, *WC2*, *WC4*, *WC5*. Các gen phân lập từ cDNA có độ tương đồng với nhau từ 63% đến 93%, trong đó *WC1* và *WC3* giống nhau 100% về trình tự amino acid [84].

1.5.4.2. Sự biểu hiện của gen cystatin

Sự biểu hiện của gen ức chế protease thường bị giới hạn bởi các tổ chức đặc biệt hoặc không giống nhau trong những giai đoạn phát triển khác nhau của cây. Minh chứng trên một số loại thực vật cho thấy, sự có mặt của cystatin ở các thời kỳ phát triển khác nhau của cây. Biểu hiện ở ngô trong giai đoạn hạt nảy mầm [93], trong quá trình rụng lá sớm của cây rau dền [125], ở hạt khô, hạt nảy mầm và trong hoa của cây *Arabidopsis* [75].

Nghiên cứu của Massonneau và đtg (2005) nhận thấy, trong 10 gen cystatin ngô thì, *CC1* ưu tiên biểu hiện trong cờ non, hai gen *CC8*, *CC10* biểu hiện trong việc phát triển hạt, 7 gen *CC* còn lại biểu hiện trong 2 hoặc nhiều

mô khác nhau. Riêng trong điều kiện chịu ảnh hưởng của sự thiếu hụt nước có tới 5 gen cùng biểu hiện, đó là các gen *CC2*, *CC3*, *CC4*, *CC* và *CC9* [93].

Với bốn gen *CYS* của lúa mì có ba gen *WC1*, *WC2*, *WC4* biểu hiện mạnh trong giai đoạn đầu của quá trình trưởng thành hạt giống và quá trình hạt nảy mầm. Gen *WC1* biểu hiện nhiều trong lớp alleuron và nội nhũ. Gen *WC4* biểu hiện ở lớp alleuron và phôi. Còn gen *WC5* biểu hiện trong các mô mềm giai đoạn đầu cây tái sinh và trong lớp alleuron của hạt trưởng thành [53].

Trong điều kiện bất lợi (nguyên nhân do nóng, hạn, muối...), sự biểu hiện của gen cystatin tăng cao hơn trong nhiều loại cây trồng. Zhang và đtg (2008) phân lập gen cystatin từ lá cây *Arabidopsis thaliana* nhận được hai loại, kí hiệu là *AtCYSa* và *AtCYSb*, trong điều kiện môi trường bất lợi cả hai gen *AtCYSa* và *AtCYSb* đều biểu hiện nhiều hơn, đó là lý do để nhóm tác giả khuyến cáo có thể sử dụng cystatin để nâng cao khả năng chống chịu của thực vật với môi trường bất lợi [132].

Đặc tính tăng sự biểu hiện của gen cystatin trong điều kiện bất lợi về môi trường còn được phát hiện trên nhiều cây trồng khác và từ nhiều phần khác nhau của cây, những kết quả thu được đều chứng tỏ có mối liên quan của cystatin với khả năng chống chịu hạn của thực vật (bảng 1.2).

Kết quả tìm kiếm gen cystatin liên quan đến khả năng chống chịu hạn ở thực vật trên bảng 1.2 cho thấy, nguồn tách chiết gen cystatin có thể từ nhiều phần khác nhau của cây. Các phần thường sử dụng phân lập gen cystatin là lá, rễ, thân. Trong đó, hai bộ phận lá và rễ của cây thường chịu ảnh hưởng mạnh bởi các yếu tố bất lợi của môi trường [3], [4], [44], [119].

Bảng 1.2. Gen cystatin liên quan với khả năng chống chịu hạn ở một số loài thực vật

Tên loài thực vật	Tên gen cystatin	Nguồn tách chiết	Tên tác giả, năm công bố
<i>Đậu cove</i> (<i>Vigna unguiculata</i> L. Walp)	<i>VuC1</i>	lá	Diop và đtg, 2004 [57]
Rau dền (<i>Amaranthus hypohondiracus</i>)	<i>AhCPI</i>	thân, rễ	Valdes và đtg, 2007 [125]
Cây cải biển (<i>Cakile maritima</i>)	<i>CmC</i>	lá	Megdiche và đtg, 2009 [96]
Lúa mì đông (<i>Triticum aestivum</i>)	<i>TaMDC1</i>	lá, rễ	Christova và đtg, 2006 [52]

So với các thực vật khác, nghiên cứu về cystatin và gen cystatin ở cây lạc còn ít được công bố. Kết quả nghiên cứu bởi Yan và đtg (2004) cho thấy mRNA tách trong hạt của loài *Arachis hypogaeae* là một polynucleotide dài 297 nucleotide, mã hoá chuỗi polypeptide dài 98 amino acid (AY722693), vùng nghiên cứu được cho là ức chế cysteine proteinase có trình tự QVVAG kéo dài từ vị trí 49 đến 53 [134]. Đặc điểm cấu trúc này cũng là kết quả nghiên cứu của nhóm tác giả Srinivansan và đtg (2008) khi tách chiết cystatin từ loài *Arachis diogoi* (Mã số: EU723567) [133].

Như vậy, cystatin là protein ức chế hoạt động của cysteine proteinase được tìm thấy trong nhiều loài sinh vật. Ở thực vật, cystatin được gọi là phytocystatin bởi sự có mặt một đoạn trình tự bảo thủ và đặc trưng của giới là LARFAV. Các vùng CYS ức chế trung tâm hoạt động của cysteine proteinase

rất bảo thủ và đã được xác định trên nhiều loài thực vật. Biểu hiện của cystatin ở nhiều giai đoạn sinh trưởng- phát triển khác nhau. Chức năng của cystatin được bàn luận bởi mối liên quan của nó với tính chống chịu các yếu tố bất lợi của ngoại cảnh, đặc biệt là tính chống chịu hạn... đó là căn cứ để chúng tôi tiếp tục nghiên cứu, phân tích cystatin trên cây lạc.

Chương 2

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. VẬT LIỆU THỰC VẬT

Vật liệu nghiên cứu của luận án là 10 giống lạc có nguồn gốc khác nhau. Trong đó, 8 giống (L05, L16, L18, L23, L24, V79, MD7, MD9) được cung cấp bởi Trung tâm Nghiên cứu và phát triển đậu đỗ, Viện Cây Lương thực và Cây Thực phẩm Việt Nam. Giống SD30 do Trung tâm Khuyến Nông tỉnh Nam Định cung cấp. Giống lạc đỏ (Đỏ BG) do Trung tâm phát triển đậu đỗ huyện Việt Yên, Bắc Giang cung cấp. Một số đặc điểm của các giống nghiên cứu được trình bày ở bảng 2.1.

Bảng 2.1. Một số đặc điểm của 10 giống lạc nghiên cứu

Giống lạc	Nguồn gốc	TGST (ngày)	Đặc điểm sinh học, khả năng chống chịu
L05	Nhập nội từ ICRISAT, năm 1999	110-120	Lá to, màu xanh nhạt, nhiễm bệnh héo xanh vi khuẩn. Tỷ lệ nhân 73-75%. Năng suất 24-27 tạ/ha, hạt lạc màu hồng sáng, khối lượng 100 hạt 43-52g. Khả năng chịu hạn khá
L16	Giống lai tạo của Trạm Xuyên/V79/ICGV871 57, năm 1992	120-125	Sinh trưởng khỏe, lá màu xanh vàng, nhiễm bệnh lá trung bình. Vỏ quả mỏng nhẵn, hạt lạc màu hồng cánh sen. Khối lượng 100 hạt 55-60g. Khả năng chịu hạn khá.
L18	Nhập nội từ Trung Quốc, năm 2004	120-130	Sức sinh trưởng tốt, lá xanh đậm, kháng bệnh lá và bệnh héo xanh vi khuẩn khá. Tỷ lệ nhân 69-71%. Năng suất 55-70 tạ/ha, quả to, eo quả trung bình, gân rõ, vỏ lụa màu hồng. Khối lượng 100 hạt 60-65g. Khả năng chịu hạn kém.
L23	Nhập nội từ Trung Quốc,	120-135	Thân đứng, tán gọn, lá màu xanh đậm, kháng bệnh lá và bệnh héo xanh vi khuẩn khá. Tỷ lệ

	năm 2001		nhân 70-72%. Năng suất 45-55 tạ/ha, quả to, eo và gân quả nông, vỏ lụa màu hồng. Khối lượng 100 hạt 60-65g. Khả năng chịu hạn tốt
L24	Nhập nội từ Trung Quốc, năm 2001	120-135	Thân đứng, tán gọn, lá màu xanh đậm, kháng bệnh lá và bệnh héo xanh vi khuẩn khá. Tỷ lệ nhân 70-72%. Năng suất 45-55 tạ/ha, quả to, eo và gân quả nông, vỏ lụa màu hồng. Khối lượng 100 hạt 60-65g. Khả năng chịu hạn khá.
V79	Giống đột biến tạo ra từ giống lạc Bạch sa. (Trung Quốc), năm 1995	120-130	Thân đứng, tán gọn, lá màu xanh đậm, kháng bệnh lá và bệnh héo xanh vi khuẩn khá. Tỷ lệ nhân 73-75%. Năng suất 27,9 tạ/ha, quả trung bình, gân quả nông, vỏ lụa màu hồng. Khối lượng 100 hạt 48-50g. Khả năng chịu hạn khá.
MD7	Nhập từ Trung Quốc, năm 2000	100-120	Thân đứng, tán gọn, lá nhỏ màu xanh đậm, kháng bệnh lá và bệnh héo xanh vi khuẩn cao. Tỷ lệ nhân 71-73%. Năng suất 35-40 tạ/ha, quả to, eo và gân quả nông, vỏ lụa màu hồng. Khối lượng 100 hạt 55-60g. Khả năng chịu hạn khá.
MD9	Nhập từ Trung Quốc, năm 2006	125-130	Thân đứng, tán gọn, lá màu xanh nhạt, kháng bệnh lá và bệnh héo xanh vi khuẩn tốt. Tỷ lệ nhân 70-72%. Năng suất 38-48 tạ/ha, quả trung bình, vỏ lụa màu hồng. Khối lượng 100 hạt 55-60g. Khả năng chịu hạn khá.
SD30	Nhập từ Trung Quốc	120-135	Thân đứng, tán gọn, lá nhỏ, dày màu xanh đậm, kháng bệnh lá và bệnh héo xanh vi khuẩn khá. Tỷ lệ nhân 70-72%. Năng suất 35-40 tạ/ha, quả to, eo và gân quả nông, vỏ lụa màu hồng. Khối lượng 100 hạt 55-60g. Khả năng chịu hạn khá.
Đỏ BG	Giống địa phương	120-130	Thân đứng, tán gọn, lá màu xanh đậm, kháng bệnh lá và bệnh héo xanh vi khuẩn tốt. Tỷ lệ nhân 70-75%. Năng suất 13,5 tạ/ha, quả trung bình, vỏ lụa màu đỏ. Khối lượng 100 hạt 55-60g. Khả năng chịu hạn tốt.

2.2. Hoá chất và thiết bị

Sử dụng các loại hoá chất tinh khiết và chuyên dụng có nguồn gốc từ các hãng nổi tiếng trên thế giới, bao gồm:

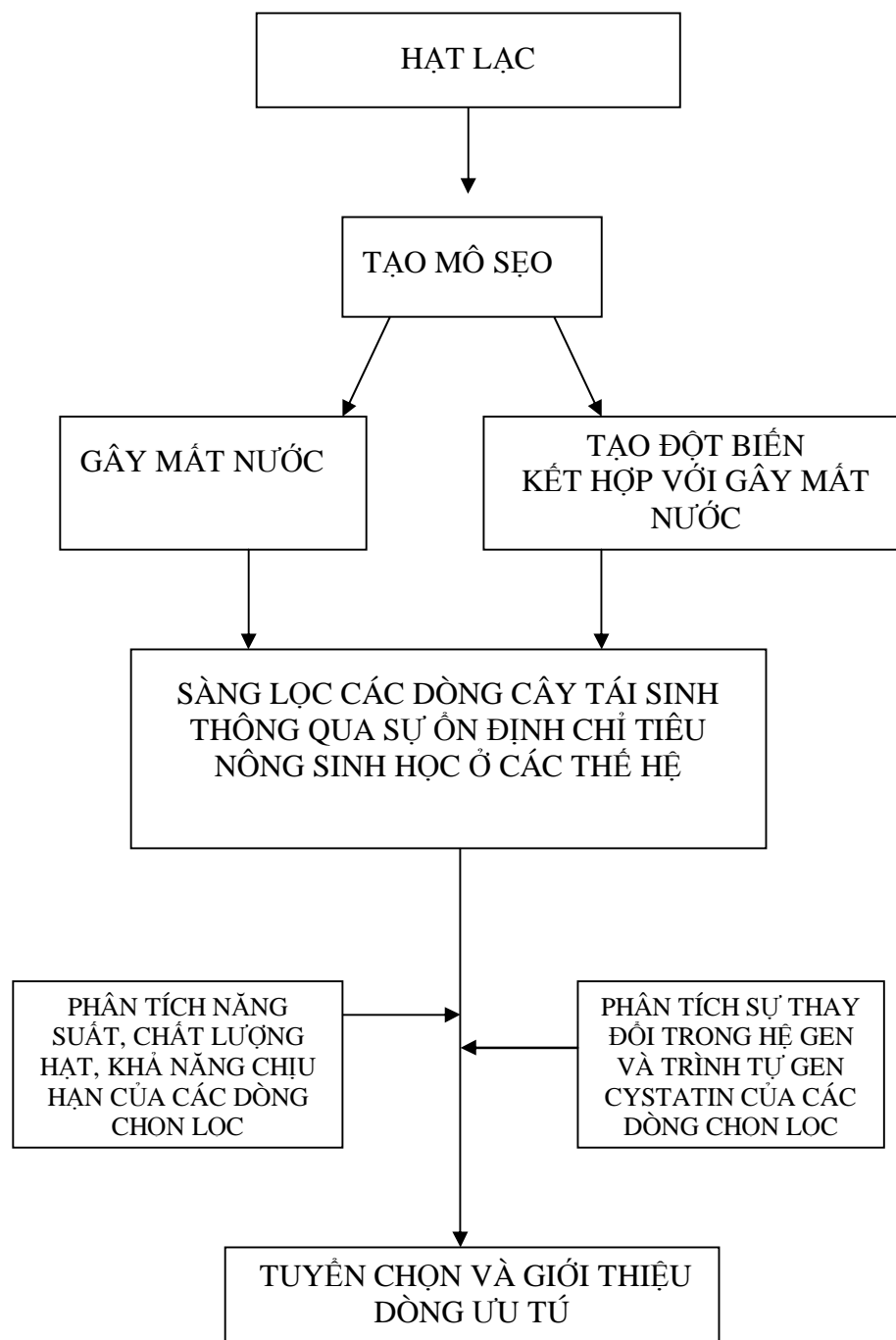
- Các chất kích thích sinh trưởng: 2,4-D; BAP; α - NAA của hãng Sigma.
- Các hoá chất dùng trong phân lập gen như *Taq*- polymerase, đệm PCR, EDTA, SDS, Tris HCl, agarose... của hãng Invitrogen.
- Vector tách dòng pBT, mồi RAPD... do phòng Công nghệ tế bào thực vật- Viện Công nghệ Sinh học cung cấp.
- Cặp mồi nhân gen cystatin được thiết kế dựa trên trình tự nucleotide của gen cystatin đã công bố (2004) tại ngân hàng gen quốc tế với mã số AY722693. Sau đó được tổng hợp tại hãng DNA- alpha.
- Các hoá chất thôi gel, tách plasmid là sản phẩm do hãng Fermentas cung cấp.

Thiết bị

Cân điện tử Sartorius (Đức), máy li tâm lạnh Hettich (Đức) máy quang phổ UV- Cintra 40 (Úc), tủ sấy Carbolite (Anh), box cấy Nuair (Tây Ban Nha), nồi khử trùng Tomy (Nhật Bản); máy PCR Applied Biosystems (USA/Singapore), máy soi và chụp ảnh gel Logic 1500 (Kodak- Mỹ), cùng với một số thiết bị khác.

2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Thí nghiệm được nghiên cứu theo mô hình tổng quát được trình bày ở hình 2.1.



Hình 2.1. Mô hình thí nghiệm tổng quát

2.3.1. Phương pháp nuôi cấy *in vitro*

Các kỹ thuật cơ bản của quá trình nuôi cấy *in vitro* thực hiện theo Nguyễn Thị Tâm và đtg (2006) [26], có cải tiến. Các kỹ thuật gồm:

- *Tạo mô sẹo*: Hạt lạc nguyên vẹn được khử trùng trong dung dịch javen 60% (30 phút), cồn 70% (1 phút). Tiếp tục làm sạch hạt bằng nước cất vô trùng. Tách phôi trực và tạo mô sẹo trên môi trường MS có bổ sung sucrose (3%), agar (0,9%), 2,4D (12mg/l), pH= 5,8. Đặt 20 mô/30ml môi trường chứa trong bình tam giác 250. Nuôi hoàn toàn trong tối, ở nhiệt độ $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Đánh giá tỷ lệ tạo mô sẹo sau 10 ngày nuôi cấy theo công thức:

$$C_i (\%) = \frac{N_{cp}}{N_t} \times 100\%$$

Trong đó: N_{cp} : Số phôi tạo mô sẹo; N_t : Tổng số phôi nuôi cấy; C_i : Tỷ lệ tạo mô sẹo. Tính tốc độ sinh trưởng của mô sẹo bằng cách cân khối lượng các mô được tạo thành sau 10 ngày.

- *Xử lý tạo đột biến*: Mô sẹo được tạo thành sau 10 ngày đem chiếu xạ tia gamma (nguồn Co^{60}) tại trung tâm chiếu xạ Quốc Gia (Từ Liêm, Hà Nội) với 5 liều chiếu 0,5krad; 1krad; 2krad; 3krad; 4krad.

- *Xử lý mất nước*: Các mô sẹo bao gồm những mô chịu chiếu xạ và mô không chịu chiếu xạ được cắt gọn theo chiều ngang từ phía đầu thân phôi thành các đơn vị có khối lượng khoảng từ 100mg đến 150mg. Sau đó, thổi khô mô sẹo bằng luồng khí vô trùng của box cấy (hãng sản xuất Nuair, 2003, Tây Ban Nha) với các ngưỡng thời gian xác định 3 giờ, 6 giờ, 9 giờ, 11 giờ. Nhiệt độ phòng ổn định ở 25°C .

Xác định độ mất nước của mô sẹo ở các ngưỡng thời gian theo công thức:

$$W_1 (\%) = \frac{W_f - W_d}{W_f} \times 100\%$$

Trong đó: W_1 : Độ mất nước (%); W_f : Trọng lượng mô tươi (mg); W_d : Trọng lượng mô khô (mg)

- *Tái sinh cây*: Các khối mô đã xử lý mất nước được chuyển lên môi trường tái sinh (MS, sucrose 3%, agar 0,9%, BAP 2mg/l, pH=5,8) nuôi dưới ánh sáng đèn của phòng cây với cường độ 2000lux, thời gian chiếu sáng 17/24 giờ, nhiệt độ $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

Xác định khả năng chịu mất nước của mô sẹo sau 4 tuần nuôi phục hồi theo công thức:

$$S_v (\%) = \frac{N_{sv}}{N_t} \times 100\%$$

Trong đó: S_v : Tỷ lệ mô sẹo sống sót (%); N_{sv} : Tổng số mô sẹo sống sót; N_t : Tổng số mô sẹo xử lý.

Xác định khả năng chịu mất nước thông qua tỷ lệ sống sót của mô sẹo sau xử lý bởi thời khô và khả năng tái sinh cây sau 6 tuần nuôi cấy.

Tỷ lệ cây tái sinh được tính theo công thức:

$$R_c (\%) = \frac{N_r}{N_{sv}} \times 100\%$$

Trong đó: R_c : Khả năng tái sinh cây; N_r : Tổng số mô tái sinh cây; N_{sv} : Tổng số mô sống sót

Số lượng mẫu thí nghiệm nghiên cứu về mức độ mất nước ở các thời điểm xử lý khác nhau của 10 giống lạc đảm bảo lớn hơn 30 mẫu.

- *Tạo cây hoàn chỉnh*: Mỗi chồi cây sống sót và đạt kích thước khoảng 2,0 - 2,5cm được chuyển vào môi trường ra rễ (MS, sucrose 3%, agar 0,9%, NAA 0,5mg/l, 0,2% than hoạt tính pH=5,8, bổ sung 20% nước dừa, nuôi cây trong ánh sáng đèn của phòng cây cường độ 2000 lux, ở nhiệt độ $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ để tạo cây hoàn chỉnh.

- *Ra cây và chế độ chăm sóc*: Sau 8 đến 10 tuần tạo cây hoàn chỉnh, toàn bộ số bình ra rễ được chuyển ra khỏi phòng nuôi cây, để trong phòng có ánh sáng tự nhiên, nhiệt độ bình thường khoảng 2 ngày; nhắc cây có bộ rễ to

khỏe ra khỏi bình nuôi, rửa sạch lớp thạch bám xung quanh rễ cây, trồng trên nền đất tơi xốp, tưới liên tục đủ ẩm bằng dung dịch MS pha loãng 10 lần. Nếu cường độ ánh sáng mạnh cần hạn chế bằng cách sử dụng bạt che chắn, tốt nhất là dùng tấm lưới cách nhiệt.

Sau khoảng 3 tuần ra cây, số cây con sống sót có rễ bám đất, xuất hiện rễ mới, thân và lá có màu xanh là bắt đầu sinh trưởng phát triển.

2.3.2. Phương pháp nghiên cứu đồng ruộng

- Trồng và theo dõi ngoài đồng ruộng: Cây tái sinh từ mô sẹo (Quần thể R_0 , RM_0) được chuyển ra trồng ngoài đồng ruộng.

Trong đó: Cây R ký hiệu là cây tái sinh từ mô sẹo chịu mất nước; cây RM là ký hiệu cây tái sinh từ mô sẹo chịu xử lý chiếu xạ tia gamma kết hợp với gây mất nước.

Mỗi cây của R_0 , RM_0 được gọi là một dòng. Các dòng được đánh dấu bằng các số, theo dõi và thu hoạch riêng để trồng vụ tiếp theo. Hạt của cây R_0 , RM_0 được gọi là thế hệ R_1 , RM_1 . Tương tự, cây của hạt R_1 , RM_1 được gọi là R_2 , RM_2 ... Chế độ chăm sóc của các dòng và giống như nhau (phụ lục 3).

- Phương pháp phát hiện và phân tích di truyền các dòng chọn lọc: Từ thế hệ thứ Nhất, thí nghiệm được bố trí riêng theo dòng và so sánh với giống gốc về các tính trạng liên quan đến các chỉ tiêu về nông học và năng suất. Số liệu xác định vào thời kỳ chín của cây bao gồm: Chiều cao thân chính (cm); số nhánh/cây; số quả chắc/cây; khối lượng 100 quả; khối lượng 100 hạt theo Vũ Công Hậu và đtg (1995) [8]. Thống kê sự biến động của tính trạng số lượng ở tất cả các dòng chọn lọc. Ở thế hệ thứ Năm, các thí nghiệm vẫn được bố trí riêng rẽ theo dòng và so sánh với giống gốc về các chỉ tiêu nông học, hóa sinh hạt, khả năng chịu hạn, sự khác biệt về hệ gen. Chọn lọc và tuyển chọn các dòng triển vọng nhất.

2.3.3. Phương pháp sinh lý, hoá sinh

2.3.3.1. Phương pháp phân tích hóa sinh

- Định lượng protein hoà tan theo phương pháp Lowry; Chiết protein trong đệm phosphat citrat (pH=10) qua đêm ở nhiệt độ 4⁰C, tạo phản ứng màu của dịch chiết với thuốc thử foling và đối chiếu với đồ thị xây dựng bằng protein chuẩn ở bước sóng 750nm để xác định lượng protein trong nguyên liệu. Protein tan được tính bằng % khối lượng khô (Nguyễn Văn Mùi, 2001) [18].

- Định lượng lipid bằng máy Soxhlet. Lipid được chiết rút ra khỏi mẫu bằng CHCl₃ trên máy Soxhlet. Hàm lượng lipid có trong nguyên liệu được tính theo đơn vị % ở độ khô tuyệt đối bằng hiệu số của khối lượng mẫu trước và sau khi chiết lipid (Nguyễn Văn Mùi, 2001) [18].

- Xác định hoạt độ của α -amylase theo phương pháp Heinkel trên nguyên tắc so sánh dựa vào sự giảm cường độ màu của hỗn hợp phản ứng với thuốc thử I₂ [5].

+ Chiết enzyme trong đệm phosphat pH=6,8

+ Trộn phản ứng gồm 0,5ml tinh bột 1% trong đệm phosphat

0,5ml NaCl 0,1%

1,0ml đệm phosphat

0,5ml dịch chiết enzyme

Lắc đều ủ ở 30⁰C trong 30phút. Bổ sung 2,5ml dung dịch sunfosalisilic acid 20%.

Lấy 0,5ml dịch ở trên, bổ sung 5ml I₂ 1% loãng 150 lần. Lắc đều, để 5 phút và so màu ở bước sóng 560nm.

Ống kiểm tra tiến hành song song với ống thí nghiệm nhưng thay dung dịch axit vào trước, sau đó mới cho dịch chiết enzyme.

Đường chuẩn để xác định hoạt độ α -amylase xây dựng bằng tinh bột chuẩn.

- Xác định hàm lượng đường bằng phương pháp vi phân tích [2].

- + Chiết đường bằng nước cất
- + Trộn phản ứng gồm 2ml dịch đường và 2ml kaliferixianua. Lắc đều, để cách thủy sôi 15 phút
- 4ml hỗn hợp $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 0,1% và gelatin 10% (tỷ lệ 20:1)
- Định mức thành 20ml, lắc đều.
- Đo ở bước sóng 585nm với đường chuẩn làm bằng glucose.

2.3.3.2. Phương pháp đánh giá nhanh sức sống của tế bào và mô bằng cách nhuộm màu với TTC

Mô sẹo của 10 giống lạc sau khi tiến hành xử lý thổi khô mất nước dùng xác định nhanh sức sống của tế bào và mô trong quá trình nuôi cấy *in vitro* bằng phương pháp nhuộm TTC theo Towill và dtg (1975) [123]. Các bước tiến hành như sau:

- (1) Cân 0,6g TTC pha loãng trong 25ml nước cất.
- (2) Cân 0,3g mô sẹo cho vào ống nghiệm, thêm 0,5ml MS pha loãng 10 lần và 0,25ml dung dịch TTC. Để tối 12 giờ ở nhiệt độ 25⁰C.
- (3) Gạn bỏ phần nước trong ống nghiệm. Rửa mô sẹo đã nhuộm bằng nước cất. Sau đó thêm vào 5ml cồn 90%, thủy phân ở nhiệt độ 60⁰C trong 1 giờ.
- (4) Đo dung dịch thu được ở bước sóng 485nm. Đối chứng là cồn 90%.

2.3.3.3. Phương pháp đánh giá khả năng chịu hạn ở giai đoạn hạt nảy mầm

Hạt lạc ngâm trong nước sạch khoảng 4 giờ, sau đó ủ trong dung dịch sorbitol 7%. Sau 3 ngày, 5 ngày, 7 ngày, 9 ngày ủ, lấy mẫu ra, xác định đồng thời hoạt độ của α -amylase và hàm lượng đường theo mô tả ở mục 2.3.3.1.

2.3.3.4. Phương pháp đánh giá khả năng chịu hạn ở giai đoạn cây non

- Đánh giá khả năng chịu hạn ở giai đoạn cây non bằng phương pháp gây hạn nhân tạo theo Lê Trần Bình và dtg (1998) [1]: Hạt lạc nảy mầm đem gieo vào các chậu (kích thước 22cm x 10cm) chứa cát vàng đã rửa sạch, mỗi

chậu trồng 10 cây. Thời gian đầu tưới nước cho đủ ẩm, khi cây có 3 lá thật, ngừng tưới nước và theo dõi các chỉ tiêu liên quan đến khả năng chịu hạn.

Mức độ héo của cây được xác định sau 1 ngày, 3 ngày, 5 ngày, kể từ khi lô thí nghiệm bắt đầu có cây héo. Sau 5 ngày để hạn, tiến hành tưới nước phục hồi. Các chỉ tiêu theo dõi:

Tỷ lệ cây không héo; Tỷ lệ cây phục hồi; Chỉ số chịu hạn tương đối.

Khả năng chịu hạn của cây được xác định bằng chỉ số chịu hạn tương đối và biểu diễn bằng đồ thị hình rada, gồm các trục a, b, c, d, e, f, tương ứng với các chỉ tiêu theo dõi.

$$S_n = 1/2 * \sin\alpha * (a_n b_n + b_n c_n + c_n d_n + d_n e_n + e_n f_n + f_n a_n)$$

Trong đó: α : là góc được tạo bởi hai trục mang trị số gần nhau và $\alpha = 360^\circ / 6 = 60^\circ$

n: ký hiệu của giống và các dòng nghiên cứu

a: % cây không héo sau 1 ngày hạn

b: % cây phục hồi sau 1 ngày hạn

c: % cây không héo sau 3 ngày hạn

d: % cây phục hồi sau 3 ngày hạn

e: % cây không héo sau 5 ngày hạn

f: % cây phục hồi sau 5 ngày hạn

Cây có chỉ số chịu hạn tương đối càng lớn thì khả năng chịu hạn càng cao và ngược lại.

2.3.4. Phương pháp sinh học phân tử

2.3.4.1. Tách chiết DNA tổng số

Tách chiết DNA tổng số theo phương pháp của Gawel và dtg (1991) [65].

- Thành phần đệm rửa: Tris HCl 1M: 2ml; EDTA 0,5M, pH=8: 0,2ml; Sorbitol 2M: 3,5ml; NaH₂PO₄ 0,4%; Nước cất vừa đủ: 20ml.

- Thành phần đệm chiết: Tris HCl 1M, pH=8: 1ml; NaCl 5M: 2,8ml; EDTA 0,5M, pH 4,8: 0,4ml; CTAB 4%; Nước cất vừa đủ 10ml.

Các bước cơ bản gồm phá vỡ màng tế bào bằng nghiền lá tươi với nitor lỏng, chiết DNA bằng dung dịch CTAB, loại protein và tạp chất bằng hỗn hợp chlorofom/isoamyl với tỷ lệ 24:1.

Xác định hàm lượng và độ tinh sạch DNA bằng cách đo quang phổ hấp thụ trên máy quang phổ UVvis Cintra 40 (Australia) và điện di trên gel agarose 0,8% trong TAE.

2.3.4.2. Kỹ thuật RAPD

- Phân tích đa hình DNA bằng kỹ thuật RAPD, với 25 mẫu ngẫu nhiên theo William và đtg (1990) [129]. Các mẫu do phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ Sinh học cung cấp (phụ lục 2).

Mỗi ống phản ứng PCR có 25μl dung dịch chứa: 2,0μl đệm PCR 1X, 2,0μl MgCl₂ (25mM), 1,2 μl dNTP (2,5mM), 1,6μl môi (10mM), 0,4μl *Taq* polymerase (5U/μl), 0,8μl DNA hệ gen (10ng/μl), nước cất vừa đủ.

Phản ứng PCR-RAPD thực hiện theo chu trình nhiệt gồm 6 bước: 94⁰C trong 3 phút, 92⁰C trong 1 phút, 35⁰C trong 1 phút, 72⁰C trong 1 phút, từ bước 2 đến bước 4 lặp lại 45 chu kỳ, 72⁰C trong 10 phút, giữ ở 4⁰C.

Phân tích sản phẩm PCR bằng cách điện di trên gel agarose 1% trong TAE 1X, sản phẩm điện di nhuộm trong dung dịch ethidium bromide và chụp ảnh dưới ánh sáng đèn cực tím.

2.3.4.3. Kỹ thuật phân lập gen cystatin

Phân lập gen cystatin được thực hiện theo mô tả của Chu Hoàng Mậu (2008) [16], các bước cơ bản gồm:

- **Nhân bản gen:** gen cystatin được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi được thiết kế dựa trên trình tự nucleotide của gen cystatin đã công bố tại Ngân hàng gen quốc tế với mã số AY722693 [134]. Cặp mồi Cys-AraF/Cys-AraR được thiết kế có trình tự nucleotide như sau:

Cys-AraF: 5' ATGGCAGCAGTGGGTGCA 3'

Cys-AraR: 5' TTAAGCATTGGAGCCATCAC 3'

Phản ứng được tiến hành trong hỗn hợp gồm: DNA hệ gen (100ng/μl) 1μl; mồi (10pmol/μl): 2,0μl; dNTPs (2,5mM): 2,0μl; Mg⁺²(25nM): 2,5μl; *Taq* polymerase (5U/μl): 0,5μl; đệm PCR (10X): 2,5μl; Nước khử ion: đủ 25 μl.

Hỗn hợp được thực hiện với 30 chu kỳ phản ứng, các giai đoạn gồm: 94⁰C/3 phút, 94⁰C/30 giây, 56⁰C/1 phút, 72⁰C/1 phút, 72⁰C/10 phút và lưu giữ sản phẩm 4⁰C.

Sản phẩm PCR được làm sạch bằng bộ kit của hãng Fermentas.

Tạo plasmid tái tổ hợp

Ghép nối đoạn gen đã làm sạch vào vector tách dòng pBT bằng bộ kit pGEM-T System.

Thành phần phản ứng ghép nối có: Vector pBT: 1μl; đệm ligation 10X: 2μl; T4-ligase (2U/ml): 0,5μl; Sản phẩm thô gel: 7,0μl; Nước khử ion vừa đủ 20μl.

Hỗn hợp được ủ ở 22⁰C, trong 1 giờ 30 phút, sau đó bảo quản ở 4⁰C.

Biến nạp plasmid tái tổ hợp vào khuẩn *E.coli* chủng DH5α bằng phương pháp sốc nhiệt:

Lấy 7-9μl plasmid tái tổ hợp vào 200μl tế bào khả biến.

Đặt hỗn hợp vào đá 30 phút, sau đó chuyển vào bể ổn nhiệt 42⁰C trong 1 phút, rồi lại chuyển vào đá 5 phút.

Bổ sung 400 μ l LB (1% pepton, 1% NaCl, 0,5% cao nấm men, nước cất vừa đủ), nuôi lắc 200 vòng/phút trong 60 phút ở 37⁰C.

Sản phẩm nuôi lắc cấy trải trên môi trường LB (có chứa agar 1,6%), bổ sung ampicilin 100mg/l, IPTG 0,1mM, X-gal 40mg/l. Nuôi đĩa khuẩn ở 37⁰C khoảng 16 giờ.

Tách và chọn dòng gen được tiến hành theo Sambrook và đtg (2001) [114].

Chọn khuẩn lạc trắng nuôi trong môi trường LB lỏng có bổ sung ampicilin, kiểm tra sản phẩm chọn dòng bằng phản ứng colony-PCR. Thành phần phản ứng tương tự như thực hiện phản ứng khuếch đại gen nhưng thay DNA khuôn đã được tinh sạch bằng khuẩn lạc mang DNA tái tổ hợp.

Sản phẩm chọn dòng được điện di kiểm tra trên gel agarose 1%.

Tinh sạch plasmid

Thu nhận khuẩn bằng cách ly tâm dịch nuôi trên ở 3000 vòng/ phút trong 7 phút. Sau đó làm sạch và thu nhận plasmid bằng bộ kit Gene JETTM Plasmid Miniprep (Fermentas)

Xác định trình tự DNA được thực hiện trên máy xác định trình tự DNA tự động ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer.

2.3.5. Phương pháp phân tích số liệu

- Phân tích các trị số thống kê bằng phần mềm Excel theo hướng dẫn của Chu Hoàng Mậu (2008) [16].

Các giá trị bao gồm: giá trị trung bình (\bar{X}), phương sai (σ^2), độ lệch (σ), sai số ($S\bar{X}$), và hệ số biến động (Cv%).

- Phân tích số liệu RAPD bằng phần mềm NTSYSpc version 2.0 (Applied Biostatisc Inc., USA, 1998) theo hướng dẫn của Chu Hoàng Mậu (2008) [16].

Dựa trên sự xuất hiện hay không xuất hiện của các phân đoạn DNA khi điện di sản phẩm RAPD bằng DNA hệ gen các dòng chọn lọc với các môi

ngẫu nhiên để làm cơ sở cho phân tích số liệu. Kết quả phân tích sự sai khác di truyền và sơ đồ hình cây thể hiện mối quan hệ ở mức phân tử của các dòng chọn lọc so với giống gốc.

Tính hệ số di truyền theo công thức:

$$H_{RAPD} = \sum_i^n f_i^2$$

H_{RAPD} là hệ số đa dạng di truyền; f_i là tần suất của alen thứ i

- Trình tự gen được xử lý trên máy vi tính bằng phần mềm BioEdit và DNASTar. So sánh trình tự gen, trình tự amino acid bằng phần mềm MegAlign và BioEdit.

2.4. ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU

Thí nghiệm được tiến hành tại các phòng thí nghiệm Di truyền học, Công nghệ tế bào thực vật, Hoá sinh học của Trường Đại học Sư phạm; Phòng thí nghiệm Sinh học của Trường Đại học Khoa học; Phòng thí nghiệm Sinh học phân tử và Công nghệ gen của Viện Khoa học Sự Sống, thuộc Đại học Thái Nguyên.

Xử lý chiếu xạ bởi tia gamma, nguồn Co^{60} tại Trung tâm chiếu xạ Quốc gia, Từ Liêm- Hà Nội.

Trình tự DNA được xác định trên thiết bị giải trình tự DNA tự động tại Viện Công nghệ Sinh học.

Thí nghiệm đồng ruộng thực hiện tại Tổ Rừng Vầu, Phường Quang Vinh- Thành phố Thái Nguyên.

Chương 3

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. KẾT QUẢ TẠO DÒNG CHỊU HẠN BẰNG KỸ THUẬT XỬ LÝ MÔ SẸO TRONG HỆ THỐNG NUÔI CẤY *IN VITRO*

3.1.1. Sàng lọc dòng mô sẹo chịu tác động của thối khô

3.1.1.1. Khả năng tạo mô sẹo và độ sinh trưởng của mô sẹo 10 giống lạc nghiên cứu

Với mục đích đánh giá khả năng tạo mô sẹo của các giống lạc trong hệ thống nuôi cấy *in vitro* làm cơ sở cho các nghiên cứu tạo dòng lạc chịu hạn bằng công nghệ tế bào thực vật, chúng tôi tiến hành thăm dò khả năng tạo mô sẹo từ các tế bào phôi mầm của hạt và tốc độ sinh trưởng của mô sẹo ở 10 giống lạc nghiên cứu, kết quả được trình bày ở bảng 3.1.

Bảng 3.1 cho thấy, tất cả các giống lạc nghiên cứu đều có khả năng tạo mô sẹo. Ở cùng một điều kiện nuôi cấy, các giống có sự sai khác về tỷ lệ tạo mô sẹo và kích thước khối mô sẹo tạo thành.

Tỷ lệ tạo mô sẹo từ phôi mầm của 10 giống lạc dao động từ 82,71% (L18) đến 98,55% (V79). Các giống lạc có tỷ lệ tạo mô sẹo đạt trên 97% là các giống MD7, MD9, V79. Giống có tỷ lệ tạo mô sẹo thấp hơn 90% gồm các giống L18, L23, Đỏ BG. Trong đó, tỷ lệ tạo mô sẹo thấp nhất là giống L18 (82,71%).

Khối lượng mô sẹo của các giống lạc được tạo thành dao động từ 115,00mg (L18) đến 198,00mg (V79). Các giống L05, L23, MD7, MD9, SD30, V79 có khối lượng mô sẹo đạt trên 180mg. Bốn giống L16, L18, L24 và Đỏ BG có khối lượng mô sẹo tạo thành nhỏ hơn 160mg.

Bảng 3.1. Tỷ lệ tạo mô sẹo và khối lượng mô sẹo của 10 giống lạc

STT	Giống lạc	Tỷ lệ tạo mô sẹo sau 10 ngày (%)	Khối lượng mô sẹo (mg/mô)
1	L05	95,16	193,33 ± 5,42
2	L16	95,48	142,00 ± 5,83
3	L18	82,71	115,00 ± 6,45
4	L23	89,93	181,87 ± 5,63
5	L24	90,74	151,67 ± 9,46
6	MD7	98,40	185,71 ± 8,75
7	MD9	97,01	194,26 ± 5,27
8	SD30	91,05	196,18 ± 4,53
9	V79	98,55	198,00 ± 6,63
10	Đỏ BG	86,03	158,33 ± 5,87

Trong cùng môi trường nuôi cấy *in vitro*, tỷ lệ tạo mô sẹo và tốc độ sinh trưởng của mô sẹo phản ánh sự biểu hiện khác nhau của kiểu gen các giống lạc. Kết quả thu được cho thấy, khả năng tạo mô sẹo và sự sinh trưởng của mô sẹo 10 giống lạc đáp ứng cho các nghiên cứu tiếp theo trong chọn dòng tế bào.

3.1.1.2. Khả năng chịu mất nước của mô sẹo các giống lạc nghiên cứu

Để xây dựng quy trình chọn lọc dòng tế bào chịu mất nước ở lạc, chúng tôi cắt các khối mô thu được thành các phần có khối lượng tương đương nhau, khoảng từ 100mg đến 150mg. Sau đó, xác định ngưỡng chịu mất nước của tế bào mô sẹo các giống lạc bằng kỹ thuật thổi khô.

Với các mức thời gian 3 giờ, 6 giờ, 9 giờ, 11 giờ thổi khô liên tục, lượng nước trong mô sẹo giảm dần tới mức rất ít có thể bay hơi được. Đánh giá khả năng chịu mất nước của mô sẹo được tiến hành thông qua xác định độ mất nước, khả năng chịu mất nước và khả năng tái sinh cây.

Độ mất nước của mô sẹo

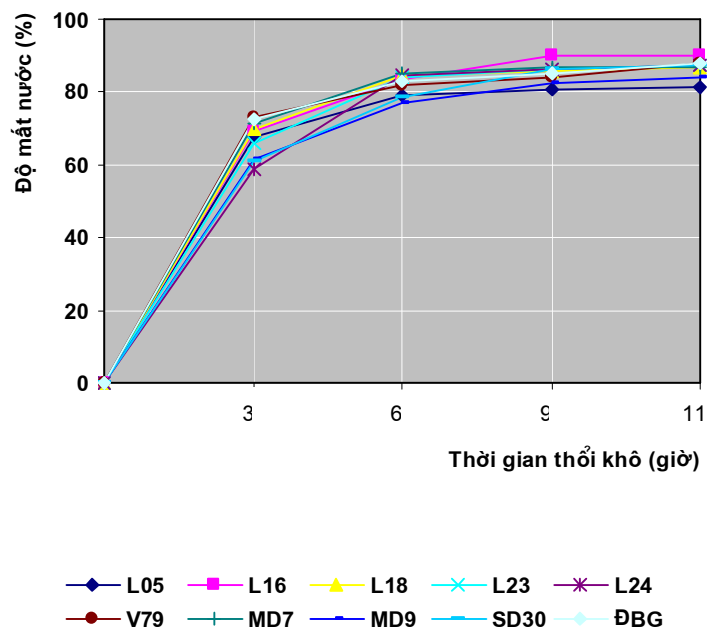
Độ mất nước của mô sẹo được tính thông qua kết quả xác định khối lượng mô trước và sau khi thổi khô. Kết quả xác định mức độ mất nước của mô sẹo sau xử lý bằng kỹ thuật thổi khô được trình bày ở bảng 3.2 và hình 3.1.

Bảng 3.2. Độ mất nước của mô sẹo sau xử lý bằng kỹ thuật thổi khô
(% so với khối lượng mô ban đầu)

STT	Giống	Thời gian thổi khô (giờ)			
		3	6	9	11
1	L05	67,37 ± 0,88	78,90 ± 0,64	80,59 ± 1,28	84,34 ± 0,69
2	L16	69,11 ± 0,58	83,68 ± 0,65	89,89 ± 0,43	90,08 ± 0,47
3	L18	70,04 ± 0,77	84,71 ± 0,62	85,81 ± 0,32	86,60 ± 0,10
4	L23	66,21 ± 0,90	84,18 ± 1,09	86,00 ± 0,60	87,05 ± 0,88
5	L24	58,66 ± 0,64	84,67 ± 0,81	86,03 ± 0,82	87,09 ± 0,84
6	MD7	71,66 ± 0,86	84,99 ± 0,48	86,64 ± 0,73	86,82 ± 0,58
7	MD9	61,45 ± 0,81	77,19 ± 0,30	82,61 ± 0,31	85,18 ± 0,50
8	SD30	60,73 ± 0,67	78,47 ± 0,57	86,19 ± 0,79	87,14 ± 0,09
9	V79	73,01 ± 0,58	81,85 ± 0,51	84,05 ± 0,28	87,97 ± 0,48
10	Đỏ BG	72,33 ± 0,33	83,03 ± 0,52	85,03 ± 0,61	88,11 ± 0,48

Kết quả trình bày ở bảng 3.2 cho thấy, sau 3 giờ thổi khô liên tục, mô sẹ của các giống lạc bị mất nước từ 58,66% (L24) đến 73,01% (V79) so với khối lượng mô ban đầu.

Mô sẹ của các giống đều tăng độ mất nước khi thời gian thổi khô càng dài. Độ mất nước ở 6 giờ dao động trong khoảng 77,19% (MD9) đến 84,99% (MD7). Mức nước mất sau 9 giờ từ 80,59% (L05) đến 89,89% (L16). Sau 11 giờ thổi khô lượng nước mất dao động từ 84,34% (L05) đến 90,08% (L16).



Hình 3. 1. Độ mất nước của mô sẹ các giống lạc

Tỷ lệ mất nước của mô sẹ tăng nhanh trong những giờ thổi khô đầu, giảm dần ở những khoảng thời gian sau. So với thời điểm 3 giờ, sau 6 giờ độ mất nước tăng thêm từ 8,84% (V79) đến 26,01% (L24). Đến 9 giờ, độ mất nước tiếp tục tăng từ 1,10% (L18) đến 7,72% (SD30) và sau 11 giờ, lượng nước chỉ mất thêm 0,79% (L18) đến 3,92% (V79). Nhìn chung, về tốc độ mất nước của mô sẹ giữa các giống lạc không có sự sai khác đáng kể .

Khả năng chịu mất nước của mô sẹo

Khả năng chịu mất nước của mô sẹo các giống lạc được xác định thông qua kết quả đánh giá nhanh sức sống của mô sẹo bằng phương pháp nhuộm TTC và xác định tỷ lệ sống sót của mô sẹo sau xử lý bởi thời khô.

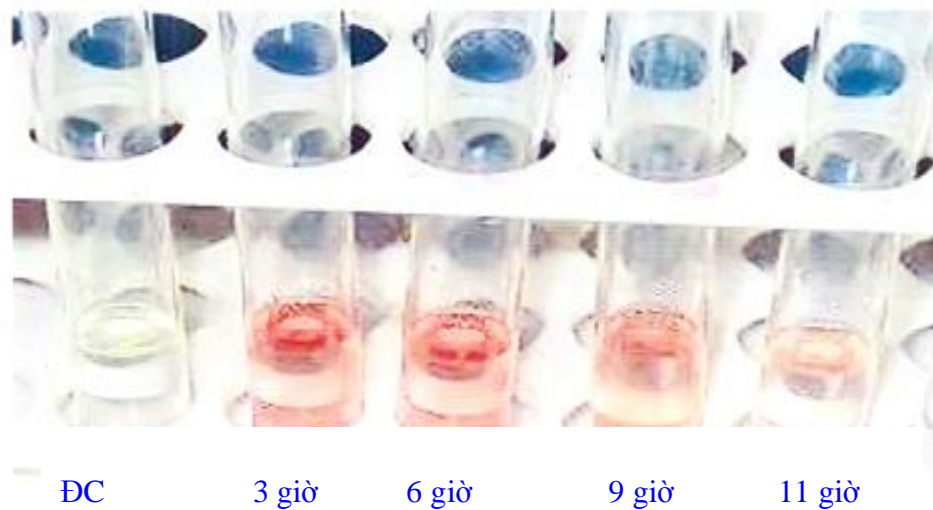
Đánh giá nhanh sức sống của mô sẹo bằng phương pháp nhuộm TTC

Bảng 3.3. Kết quả kiểm tra khả năng chịu mất nước của mô sẹo 10 giống lạc bằng phương pháp nhuộm TTC

STT	Giống lạc	Giá trị OD ₄₈₅ sau các ngưỡng xử lý thời khô (giờ)			
		3	6	9	11
1	L05	0,232 ± 0,004	0,163 ± 0,003	0,127 ± 0,003	0,093 ± 0,002
2	L16	0,133 ± 0,001	0,093 ± 0,011	0,073 ± 0,001	0,053 ± 0,001
3	L18	0,112 ± 0,001	0,082 ± 0,001	0,055 ± 0,001	0,042 ± 0,001
4	L23	0,173 ± 0,003	0,148 ± 0,003	0,128 ± 0,003	0,065 ± 0,020
5	L24	0,162 ± 0,002	0,103 ± 0,001	0,075 ± 0,001	0,053 ± 0,001
6	MD7	0,195 ± 0,002	0,140 ± 0,002	0,123 ± 0,001	0,082 ± 0,001
7	MD9	0,134 ± 0,012	0,180 ± 0,004	0,106 ± 0,035	0,062 ± 0,002
8	SD30	0,193 ± 0,011	0,175 ± 0,002	0,154 ± 0,020	0,058 ± 0,002
9	V79	0,182 ± 0,036	0,130 ± 0,001	0,108 ± 0,001	0,077 ± 0,001
10	Đỏ BG	0,133 ± 0,003	0,102 ± 0,003	0,092 ± 0,002	0,055 ± 0,001

Các tế bào còn sống bắt màu đỏ với thuốc nhuộm, tế bào chết không bắt màu. Khi ngâm với cồn 90% trong 60 phút ở 60⁰C, màu đỏ sẽ phai ra dung dịch. Đo mật độ quang của dung dịch ở bước sóng 485nm phản ánh sức sống của tế bào [123].

Xác định giá trị OD ở bước sóng 485nm của dung dịch thuốc nhuộm TTC với mô sẹ các giống lạc đã thu được kết quả khác nhau giữa các giống và các thời điểm mô sẹ chịu xử lý. Giá trị OD₄₈₅ ở ngưỡng xử lý thổi khô của các giống đều cho kết quả cao nhất ở ngưỡng thổi khô 3 giờ, sau đó giảm dần. Trong các ngưỡng thổi khô, cường độ màu của ống nhuộm mô sẹ giống lạc L18 luôn nhạt nhất và có giá trị OD₄₈₅ thấp nhất (bảng 3.3).



Hình 3.2. Dung dịch nhuộm TTC của mô sẹ giống lạc L18

ở các ngưỡng xử lý thổi khô

(ĐC: ống đối chứng bằng cồn 90%)

Xác định tỷ lệ sống sót của mô sẹo sau 4 tuần

Cây chuyển toàn bộ các tế bào sau khi xử lý bằng thổi khô gây mất nước sang môi trường tái sinh cây. Sau 4 tuần nuôi cấy, xác định tỷ lệ mô sống sót so với tổng số mô được cấy chuyển, kết quả nghiên cứu được trình bày ở bảng 3.4.

Bảng 3.4. Tỷ lệ sống sót của mô sẹo bị xử lý bằng thổi khô sau 4 tuần nuôi phục hồi (%)

STT	Giống lạc	Thời gian thổi khô (giờ)			
		3	6	9	11
1	L05	100,00 ± 0,00	75,61 ± 0,64	48,39 ± 1,08	19,05 ± 0,49
2	L16	72,41 ± 0,63	61,76 ± 0,54	50,00 ± 0,45	19,05 ± 0,44
3	L18	72,00 ± 0,72	40,74 ± 0,43	10,81 ± 0,52	9,26 ± 0,60
4	L23	76,47 ± 0,64	53,13 ± 0,81	25,00 ± 0,30	13,33 ± 0,52
5	L24	89,58 ± 0,54	56,52 ± 0,46	50,00 ± 0,44	12,50 ± 0,54
6	MD7	90,97 ± 1,03	82,05 ± 0,42	41,67 ± 0,64	15,00 ± 0,66
7	MD9	79,55 ± 0,73	56,67 ± 0,50	33,33 ± 0,41	14,29 ± 0,60
8	SD30	82,05 ± 0,55	81,06 ± 0,47	29,27 ± 0,59	15,91 ± 0,39
9	V79	88,24 ± 0,52	63,33 ± 0,54	42,42 ± 0,64	19,01 ± 0,54
10	Đỏ BG	84,62 ± 0,54	63,89 ± 0,44	34,21 ± 0,34	14,29 ± 0,61

Quan sát khả năng phục hồi của các mô sẹo bị thổi khô trên môi trường tái sinh cây chúng tôi nhận thấy, những mô sẹo sống sót trên môi trường tái sinh chuyển màu xanh và có sự gia tăng dần về kích thước mô sẹo so với kích thước khối mô ban đầu. Ngược lại, các mô không có khả năng sống sót có màu trắng xám và sau đó chết dần (ảnh C, hình 3.3).

Khả năng chịu mất nước của mô sẹo được đánh giá thông qua tỷ lệ sống sót của mô sẹo sau 4 tuần nuôi phục hồi. Tỷ lệ sống sót sau 4 tuần của

các mô sẹo mất nước tỷ lệ nghịch với thời gian thối khô. Sức sống của mô sẹo có sự khác nhau giữa các giống lạc ở cùng một ngưỡng thời gian thối khô. Sau 3 giờ thối khô liên tục, tỷ lệ sống sót của mô sẹo các giống lạc dao động từ 72,00% (L18) đến 100% (L05; MD7). Sau 6 giờ thối khô, tỷ lệ sống của mô sẹo đạt từ 40,74% (L18) đến 82,05% (MD7). Giống L18 luôn có tỷ lệ sống sót thấp nhất.

Kết quả xác định tỷ lệ sống sót của mô sẹo sau xử lý bằng thối khô thể hiện sức chịu đựng của tế bào và đây là cơ sở để sàng lọc dòng tế bào [1], [34]. Các mô sẹo chịu mất nước thu được là nguồn nguyên liệu để thực hiện tái sinh cây phục vụ chọn dòng lạc chịu hạn.

Khả năng tái sinh cây của mô sẹo chịu mất nước

Khả năng tái sinh cây là một chỉ tiêu quan trọng quyết định thành công trong chọn dòng tế bào và chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố [1]. Kết quả nghiên cứu cho thấy, tất cả các giống lạc sử dụng trong thí nghiệm đều có khả năng tái sinh cây từ các mô sẹo sống sót.

Kết quả ở bảng 3.5 cho thấy, số lượng mô sống sót của các giống lạc có khả năng tái sinh cây ở các ngưỡng thời gian thối khô khác nhau. Sau 3 giờ thối khô, mô sẹo sống sót của các giống lạc đều có khả năng tái sinh cây với tỷ lệ từ 66,13% đến 90,27%. Thời gian thối khô kéo dài đã làm giảm tỷ lệ sống sót. Tuy nhiên, các tế bào sống sót lại có khả năng tái sinh cây cao. Mô sẹo của 10 giống lạc sau 9 giờ đến 11 giờ thối khô (mô mất từ 84,05% đến 89,89% nước so với khối lượng mô tươi) có khả năng sống sót còn 10,81% đến 19,05%. Các mô sống sót cho tỷ lệ tái sinh cây từ 83,33% đến 100,00%. Căn cứ và kết quả nghiên cứu, chúng tôi chọn thời điểm mô mất trên 84% nước so với khối lượng tươi ban đầu và tỷ lệ mô sống sót trong khoảng 10% đến 20% là ngưỡng sàng lọc dòng.

Bảng 3.5. Tỷ lệ tái sinh cây của mô sẹo sống sót sau 6 tuần (%)

STT	Giống lạc	Thời gian thối khô (giờ)			
		3	6	9	11
1	L05	66,63 ± 2,37	67,10 ± 1,87	93,00 ± 4,13	100,00 ± 0,00
2	L16	74,97 ± 2,17	94,23 ± 1,28	100,00 ± 0,00	97,23 ± 2,77
3	L18	66,13 ± 0,57	68,47 ± 2,14	83,33 ± 3,61	53,33 ± 3,33
4	L23	87,70 ± 1,01	93,43 ± 0,35	96,30 ± 3,70	94,43 ± 3,94
5	L24	81,00 ± 0,23	93,27 ± 3,64	95,57 ± 2,63	100,00 ± 0,00
6	MD7	83,23 ± 1,24	83,70 ± 3,77	90,67 ± 2,16	91,67 ± 1,93
7	MD9	85,10 ± 3,55	83,43 ± 3,67	93,33 ± 3,70	96,30 ± 3,70
8	SD30	71,13 ± 1,19	83,87 ± 2,00	95,23 ± 4,77	100,00 ± 0,00
9	V79	90,27 ± 1,68	91,97 ± 0,98	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
10	Đỏ BG	75,60 ± 1,79	94,13 ± 1,23	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00

Xử lý mô sẹo lạc bằng kỹ thuật thối khô mô sẹo, chúng tôi xác định giống lạc L18 có khả năng chịu mất nước kém nhất và lựa chọn mức thối khô 9 giờ làm ngưỡng sàng lọc. Theo nghiên cứu của một số tác giả, các tế bào có khả năng chịu mất nước trong điều kiện cực đoan là những tế bào có khả năng chống chịu tốt [1], [51].

Ảnh hưởng của thối khô gây mất nước cho tỷ lệ sống sót của mô sẹo 10 giống lạc khác nhau, phụ thuộc vào khả năng chịu mất nước của các giống. Kết quả đánh giá phù hợp với công bố do Trung tâm Đậu đỗ, Viện Cây Lương thực và Cây Thực phẩm Việt Nam cung cấp (bảng 2.1), phù hợp với khả năng chịu hạn của 10 giống lạc ở giai đoạn hạt nảy mầm khi bị hạn sinh lý và giai

đoạn cây non khi bị hạn nhân tạo. Trong 10 giống lạc nghiên cứu, giống L18 có khả năng chịu mất nước kém nhất, có hoạt độ α - amylase và hàm lượng đường ở nhóm thấp trong các ngày hạt nảy mầm khi bị hạn, có chỉ số chịu hạn thấp nhất (phụ lục 4, phụ lục 5).

3.1.2. Ảnh hưởng của tia gamma kết hợp với thời khô đến tỷ lệ sống sót và tái sinh cây của giống lạc L18

Giống lạc L18 được xác định là giống có khả năng chịu hạn, chịu mất nước kém nhất trong số 10 giống lạc nghiên cứu. Bên cạnh đó, giống L18 có năng suất cao (bảng 2.1). Vì vậy, với mục tiêu cải thiện khả năng chịu hạn của giống lạc năng suất cao này, chúng tôi tiến hành thăm dò ảnh hưởng kết hợp của chiếu xạ tia gamma với sàng lọc dòng chịu mất nước bằng kỹ thuật thời khô đối với mô sẹo giống lạc L18.

Bảng 3.6. Ảnh hưởng của chiếu xạ kết hợp với thời khô 9 giờ đến tỷ lệ sống sót và tái sinh cây của mô sẹo ở giống lạc L18

Liều chiếu xạ kết hợp thời khô 9 giờ	Tỷ lệ mô sống sót (%)	Tỷ lệ tái sinh (%)	Hình thái cây tái sinh
0,5krad	34,23 ± 0,37	47,63 ± 2,37	Bình thường
1,0krad	33,65 ± 0,52	88,87 ± 5,57	Bình thường
2,0krad	28,42 ± 0,43	38,87 ± 5,54	Bình thường
3,0krad	18,87 ± 0,59	26,17 ± 4,97	Lá nhỏ, mép lá xoắn, màu lá vàng và rụng dần
4,0krad	12,51 ± 0,42	21,30 ± 6,03	Lá nhỏ, mép lá xoắn, màu lá vàng và rụng dần

Bảng 3.6 trình bày kết quả thăm dò ảnh hưởng của 5 liều lượng chiếu xạ ở mức: 0,5krad; 1,0krad; 2,0krad; 3,0krad; 4,0krad kết hợp với thời khô mô sẹo trong 9 giờ. Hiệu quả tác động kết hợp các liều lượng chiếu xạ khác nhau với thời khô liên tục được xác định thông qua tỷ lệ mô sống sót và tỷ lệ mô sống sót tái sinh cây.

Kết quả xác định tỷ lệ mô sống sót tái sinh cây cho thấy, khả năng tái sinh cây của mô sẹo chịu ảnh hưởng kết hợp của chiếu xạ với thời khô dao động từ 21,30% đến 88,87%. So với khả năng tái sinh cây của mô sống sót chỉ xử lý thời khô (bảng 3.5), thì việc xử lý mô sẹo bằng chiếu xạ kết hợp với thời khô đã làm giảm tỷ lệ tái sinh cây. Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của tia gamma đến tỷ lệ tái sinh của cây lạc cũng tìm thấy sự tương tự ở cây lúa [35].

Sự khác biệt quan trọng của cây tái sinh chịu tác động của chiếu xạ kết hợp với thời khô biểu hiện rõ nét ở đặc điểm hình thái, đặc biệt về màu sắc và hình dạng lá.

Với liều chiếu xạ thấp (0,5krad; 1krad; 2krad), lá cây vẫn có màu xanh như những cây đối chứng. Nhưng với liều chiếu xạ cao như 3krad và 4krad thì màu xanh của lá xuất hiện trong khoảng 1-2 tuần đầu sau đó lá bắt đầu chuyển màu vàng úa. Hình thái lá nhỏ và xuất hiện hiện tượng xoắn lá. Tốc độ sinh trưởng của cây tỷ lệ nghịch với cường độ của liều chiếu xạ. Ở liều chiếu xạ cao cây có hiện tượng lụi dần, thân cằn cỗi. Chiều cao cây tái sinh thấp hơn rất nhiều so với cây đối chứng (hình 3.3).

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của các liều chiếu xạ khác nhau đến khả năng tái sinh cây và hình thái lá của giống lạc L18 có điểm tương tự như kết quả nghiên cứu của Muthusamy và đtg (2007) đã công bố [101].



A



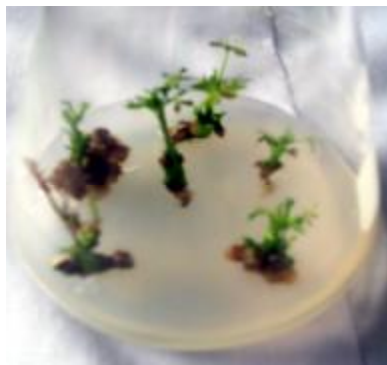
B



C



D



E



G

Hình 3.3. Một số hình ảnh cây tái sinh của giống lạc L18

ở giai đoạn 6 tuần tuổi

A: Cây tái sinh không chịu thời khô

B: Cây tái sinh chịu thời khô 9 giờ

C: Liều chiếu xạ 0,5krad + thời khô 9 giờ

D: Liều chiếu xạ 2,0krad + thời khô 9 giờ

E: Liều chiếu xạ 3,0krad + thời khô 9 giờ

G: Liều chiếu xạ 4,0krad + thời khô 9 giờ

Từ những đánh giá khả năng sống sót và tái sinh của mô sẹo sau khi xử lý bằng tia gamma, chúng tôi đã xác định được liều tới hạn của mô sẹo lạc là liều chiếu xạ 4krad. Nếu vượt quá giới hạn 4krad đa số mô sẹo chết, không thể tạo số dòng mô đủ lớn phục vụ những nghiên cứu tiếp theo, đặc biệt là nghiên cứu chọn dòng. Tuy nhiên, để thu được nhiều đột biến cần xác định liều lượng chiếu xạ thích hợp, để vừa tạo ra những biến dị di truyền có lợi, vừa có tỷ lệ các dòng mô sống sót và tái sinh cao. Do vậy, người ta thường dùng liều chiếu xạ nhỏ hơn liều tới hạn từ 1,5 đến 2,0 lần để tạo đột biến [21].

Nhận xét về kết quả sàng lọc dòng mô sẹo chịu chiếu xạ và thời khô

Liều chiếu xạ thích hợp cho giống lạc L18 là từ 0,5krad đến 2krad và liều lượng 2krad kết hợp với thời khô 9 giờ được lựa chọn để sàng lọc dòng mô và tạo cây hoàn chỉnh.

Kết quả xử lý mô sẹo trong hệ thống nuôi cấy *in vitro* của giống lạc L18 bằng thời khô liên tục 9 giờ và chiếu xạ ở liều lượng 2krad kết hợp thời khô liên tục 9 giờ đã thu được 167 dòng mô và từ đó có 198 dòng lạc được tạo ra.

3.1.3. Đặc điểm nông sinh học của các quần thể lạc R_0 và RM_0

Phân tích mức độ biến dị và đặc điểm nông sinh học của cây như chiều cao thân chính, số nhánh/cây, số quả/cây và số quả chắc/cây của các dòng thuộc 2 quần thể R_0 và RM_0 . Kết quả nghiên cứu được trình bày ở bảng 3.7 và hình 3.4.

Kết quả nghiên cứu một số đặc điểm của các quần thể lạc ở thế hệ R_0 , RM_0 ở bảng 3.7 cho thấy, các dòng lạc chuyển từ ống nghiệm ra trồng ngoài đồng ruộng (vụ xuân, 2008) có sự biến động di truyền lớn hơn nhiều so với giống gốc ở tất cả các chỉ tiêu nghiên cứu.

Bảng 3.7. Đặc điểm nông học của quần thể R₀, RM₀
tái sinh từ mô sẹo mất nước

(\bar{X} : Giá trị trung bình; $S_{\bar{X}}$: Sai số trung bình mẫu; Cv% : Hệ số biến động)

Chỉ tiêu theo dõi		Giống gốc	Quần thể R ₀	Quần thể RM ₀
Cao thân chính (cm)	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	37,00 ± 0,58	57,00 ± 4,61	18,50 ± 1,91
	Cv %	2,70	25,58	10,32
Số nhánh/cây (nhánh)	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	8,33 ± 0,33	3,00 ± 0,39	6,75 ± 0,57
	Cv %	6,93	41,57	8,38
Số quả/cây (quả)	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	20,67 ± 0,67	22,80 ± 1,81	14,00 ± 1,96
	Cv %	5,59	25,05	13,98
Số quả chắc/cây	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	16,33 ± 0,33	14,80 ± 1,50	8,17 ± 1,36
Tỷ lệ quả chắc (%)		79,00	64,91	54,65



R₀ Giống gốc RM₀

A. Khu vực thí nghiệm quần thể
R₀, RM₀

B. Cây và quả giai đoạn thu hoạch

Hình 3.4. Các dòng lạc chọn lọc trồng ở vụ xuân năm 2008

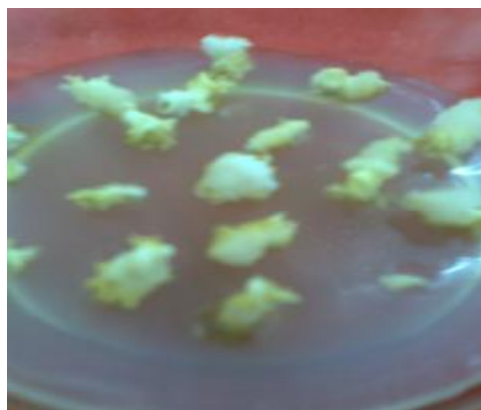
Chiều cao cây là đặc điểm sinh trưởng phụ thuộc vào giống, môi trường và điều kiện gieo trồng. Chiều cao thân chính của cây lạc thường dao động trong khoảng từ 12cm đến 65cm [8].

Nghiên cứu đặc điểm sinh trưởng của hai quần thể chịu mất nước và chịu chiếu xạ kết hợp với gây mất nước, chúng tôi nhận thấy sự xuất hiện rất rõ các đột biến về chiều cao cây. Trong đó, quần thể R_0 xuất hiện nhiều đột biến tăng chiều cao của cây, trung bình chiều cao cây của quần thể này là 57,00cm. Khác với quần thể R_0 , quần thể RM_0 xuất hiện nhiều dòng đột biến thấp cây, với chiều cao trung bình đạt 18,50cm. Chiều cao cây của quần thể R_0 biến động ở mức 25,58% và ở quần thể RM_0 là 10,32%. Nghiên cứu ảnh hưởng của liều chiếu xạ 7krad trên giống lúa Tám Xoan về đặc điểm chiều cao cây, tác giả Lê Xuân Đắc và đtg (2006) cũng thu được nhiều đột biến thấp cây, mức thấp cây của một số dòng thể hệ RM_1 chỉ bằng 50% so với đối chứng [6].

Cây từ quần thể trong ống nghiệm nhìn chung cho tỷ lệ ra nhánh thấp. Tỷ lệ đẻ nhánh của quần thể R_0 thấp hơn nhiều so với giống gốc, mức biến động di truyền là 41,57% so với đối chứng là 6,93%; Số nhánh của quần thể RM_0 đạt 6,75 nhánh/cây và là chỉ tiêu có mức biến động nhỏ ($Cv=8,38\%$).

Kết quả nghiên cứu cho thấy, số quả/cây ở quần thể R_0 của các dòng lạc chịu mất nước cao hơn so với giống gốc (giống gốc trồng từ hạt), sự biến động trong quần thể R_0 ở mức 25,05%. Lượng quả của quần thể RM_0 đạt 13,33 quả/cây, mức biến động là 13,98%. Tỷ lệ quả chắc của cây được tạo ra từ ống nghiệm đều thấp hơn so với giống gốc.

Như vậy, quá trình chọn dòng lạc chịu hạn bao gồm: (1) Tạo mô sẹo và xử lý mô sẹo; (2) Tái sinh cây và tạo cây hoàn chỉnh (3) Trồng, theo dõi và phân tích di truyền các dòng chọn lọc (hình 3.5).



A



B



C



D



E



G

Hình 3.5. Hình ảnh trong chọn dòng chịu hạn ở lạc bằng kỹ thuật nuôi cấy *in vitro*

- A. Tạo mô sẹo; B. Tái sinh cây từ mô sẹo sau xử lý thời khô;
 C. Tạo cây hoàn chỉnh; D. Cây R₀ ngoài đồng ruộng;
 E. Củ của một dòng chọn lọc thế hệ Ba
 G. Các dòng trồng thế hệ thứ Năm

Xử lý mô sẹo lạc trong nuôi cấy *in vitro*, chọn lọc mô sẹo sống sót, tái sinh cây và theo dõi quần thể R_0 và RM_0 có thể rút ra một số nhận xét sau:

(1) Các dòng có nguồn gốc từ mô sẹo chịu thời khô có chiều cao cây tăng hơn so với giống gốc; còn các dòng có nguồn gốc từ mô sẹo chịu chiếu xạ kết hợp với thời khô có chiều cao cây giảm so với giống gốc.

(2) Các quần thể cây được tạo ra bằng kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật có số nhánh/cây ít hơn so với giống gốc. Quần thể R_0 đạt 3 nhánh/cây, quần thể RM_0 đạt 6,75 nhánh/cây, giống gốc có 8,33 nhánh/cây.

(3) Quần thể R_0 có 22,80 quả/cây, nhiều hơn giống gốc (đạt 110,30% so giống gốc), quần thể RM_0 có số quả/cây ít hơn giống gốc, chỉ đạt 14,00 quả/cây (67,73% so giống gốc).

(4) Hệ số biến động di truyền các chỉ tiêu nghiên cứu của 2 quần thể cây được tạo ra bằng kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật lớn hơn so với giống gốc.

Có rất nhiều yếu tố tham gia vào việc cấu thành năng suất cũng như chất lượng hạt lạc, cần thiết phải có sự theo dõi sự ổn định của các tính trạng trong mỗi thế hệ và qua các thế hệ, đặc biệt là khả năng chịu hạn của các giống lạc.

Từ kết quả đánh giá ở thế hệ R_0 , RM_0 , chúng tôi đã chọn được 7 dòng có nguồn gốc từ mô sẹo chịu xử lý của giống lạc L18, trong đó 3 dòng có nguồn gốc từ mô sẹo chịu ảnh hưởng của thời khô là R44, R46, R48 và 4 dòng có nguồn gốc từ mô sẹo chịu ảnh hưởng của chiếu xạ kết hợp với thời khô là RM46, RM47, RM48, RM49 làm vật liệu khởi đầu để đánh giá, chọn lọc ở các thế hệ tiếp theo.

3.2. KẾT QUẢ PHÂN TÍCH NHỮNG DÒNG LẠC CHỌN LỌC QUA CÁC THỂ HỆ

3.2.1. Đặc điểm nông sinh học các dòng lạc chọn lọc ở thể hệ thứ Nhất và thứ Ba

Hạt lạc rất khó bảo quản, tỷ lệ nảy mầm thấp khi thời gian bảo quản kéo dài. Vì vậy, toàn bộ hạt của 7 dòng lạc chọn lọc ở quần thể R_0 , RM_0 chúng tôi trồng kế tiếp vào các vụ trồng trong năm. Thể hệ thứ Nhất (R_1 , RM_1) được trồng ở vụ thu đông năm 2008. Từ kết quả thu được trình bày ở bảng 3.8 có thể rút ra một số nhận xét như sau:

Cây ở thể hệ thứ Nhất vẫn duy trì sự sai khác về chiều cao thân chính, trong đó cây của các dòng có nguồn gốc từ mô sẹo chịu ảnh hưởng của chiếu xạ thấp hơn (khoảng từ 17,67cm đến 22,33cm) so với dòng chịu thời khô (từ 49,60cm đến 61,70cm). Tất cả các dòng chọn lọc đều có mức biến động về chỉ tiêu này thấp hơn giống gốc.

Số nhánh/cây của các dòng chọn lọc dao động từ 4,67 nhánh đến 8,00 nhánh. Mức độ biến động số nhánh trong khoảng 8,25% đến 19,99%; ba dòng RM_{47} , RM_{48} , RM_{49} có số nhánh/cây cao hơn giống gốc.

Số quả/cây của các dòng nghiên cứu dao động từ 14,67 quả đến 22,17 quả/cây. Hai dòng R_{46} và R_{48} có số quả/cây cao hơn so với giống gốc.

Số quả chắc/cây của các dòng chọn lọc trong khoảng 10,00- 13,67 quả/cây, tất cả các dòng chọn lọc đều có tỷ lệ quả chắc/cây thấp hơn so với giống gốc. So với các cây trồng khác như lúa, lúa mỳ, đậu xanh, đậu tương... số quả/cây của lạc ít hơn. Vì vậy, số quả/cây của các dòng chọn lọc trong những thể hệ đầu rất khó khăn cho việc thực hiện phân tích tính chịu hạn của các dòng này. Chính vì vậy, chúng tôi lựa chọn hạt và trồng liên tục ở các vụ xuân hè và thu đông hàng năm.

Bảng 3.8. Đặc điểm nông sinh học các dòng lạc chọn lọc ở thế hệ thứ Nhất ($n < 30$; $\alpha = 0,05$)

(\bar{X} : Giá trị trung bình; $s_{\bar{X}}$: Sai số trung bình mẫu; Cv %: Hệ số biến động)

Chỉ tiêu theo dõi	Cao thân chính (cm)		Số nhánh/cây		Số quả/cây		Số quả chắc/cây	
	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	Cv %	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	Cv %	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	Cv %	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	Cv %
R44	53,40 ± 3,22	19,08	5,14 ± 0,53	12,61	18,33 ± 1,23	16,42	12,40 ± 0,45	12,23
R46	49,60 ± 2,34	14,91	5,32 ± 0,33	19,99	22,17 ± 1,30	14,38	10,00 ± 0,56	17,64
R48	61,70 ± 1,19	6,11	5,03 ± 0,26	16,33	20,50 ± 1,36	16,25	11,25 ± 0,49	12,34
RM46	19,33 ± 0,67	3,45	4,67 ± 0,64	14,29	17,33 ± 1,20	6,93	13,67 ± 0,88	24,05
RM47	17,67 ± 1,45	8,22	7,00 ± 0,58	8,25	14,67 ± 1,32	9,09	10,67 ± 1,06	9,94
RM48	22,33 ± 1,33	5,97	7,33 ± 1,45	19,81	19,00 ± 3,06	16,08	11,63 ± 2,40	20,67
RM49	21,25 ± 0,83	3,91	8,00 ± 1,00	12,50	19,67 ± 1,33	6,78	11,33 ± 0,63	5,56
L18	29,90 ± 1,84	19,47	6,11 ± 0,55	18,34	19,83 ± 0,54	6,70	14,00 ± 0,60	12,07

Thế hệ thứ Nhất trồng vụ Thu Đông, năm 2008, tại Tổ Rừng Vầu, Phường Quang Vinh, Thành phố Thái Nguyên

Với mục tiêu tạo ra các dòng lạc có khả năng chịu hạn cao, chúng tôi lựa chọn kết quả đánh giá các dòng chọn lọc ở thế hệ Ba và thứ Năm để báo cáo. Đây là những thế hệ trồng liên tục ở các vụ Thu Đông năm 2009, 2010. Vụ Thu Đông thường trồng trong khoảng từ 25 tháng 8 hàng năm đến đầu tháng 1 của năm kế tiếp. Thời điểm này ở miền Bắc thường có đặc điểm lạnh và khô, đây cũng là hướng nghiên cứu của luận án. Thế hệ thứ Ba chưa có lượng quả đủ lớn, vì vậy kết quả đánh giá các dòng chọn lọc ở thế hệ này thông qua phân tích đặc điểm nông học (bảng 3.9).

Những chỉ tiêu nghiên cứu của các dòng chọn lọc ở thế hệ thứ Ba được duy trì ổn định tương đương so với giống gốc. Độ dao động của các dòng chọn lọc ở mỗi chỉ tiêu nghiên cứu là không nhiều.

So với thế hệ thứ Nhất, chiều cao cây của dòng chịu chiếu xạ kết hợp với thời khô có sự cải thiện mạnh, kết quả thể hiện trên bảng 3.9 cho thấy, trong 7 dòng nghiên cứu qua 3 thế hệ chỉ có dòng RM49 ở thế hệ thứ Ba có nguồn gốc từ mô sẹo chịu chiếu xạ kết hợp với thời khô có chiều cao cây thấp hơn giống gốc. Ở thế hệ thứ Ba có 2 dòng R46, R48 có tỷ lệ đẻ nhánh cao hơn giống gốc; sự biến động của tính trạng số nhánh/cây trong khoảng từ 3,17 đến 10,34%. Phân tích số lượng quả/cây, số quả chắc/cây của các dòng chọn lọc ở thế hệ thứ Ba, chúng tôi nhận thấy, dòng RM47 có sự ổn định và sự biểu hiện của các tính trạng nghiên cứu đều ở mức cao hơn giống gốc.

Sự biểu hiện các tính trạng số lượng đã phản ánh đặc điểm phản ứng của kiểu gen các giống lạc trước tác động của môi trường và mùa vụ. Sự ổn định khá nhanh của các tính trạng nghiên cứu ngay từ thế hệ thứ Nhất của cây lạc có nguồn gốc từ mô sẹo đã góp phần khẳng định giá trị của kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật có thể tạo giống mới và rút ngắn thời gian tạo giống, tăng hiệu quả của quá trình chọn giống.

Bảng 3.9. Đặc điểm nông sinh học các dòng lạc chọn lọc ở thế hệ thứ Ba ($n < 30$; $\alpha = 0,05$)

(\bar{X} : Giá trị trung bình; $S_{\bar{X}}$: Sai số trung bình mẫu; Cv %: Hệ số biến động)

Chỉ tiêu theo dõi	Cao thân chính (cm)		Số nhánh/cây		Số quả/cây		Số quả chắc/cây	
	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	Cv %	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	Cv %	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	Cv %	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	Cv %
R44	42,75 ± 1,52	4,65	4,83 ± 0,40	10,34	20,00 ± 1,09	5,46	18,14 ± 0,91	13,29
R46	41,64 ± 0,81	1,95	8,60 ± 0,27	9,81	20,11 ± 1,07	5,34	17,90 ± 0,91	16,12
R48	48,60 ± 2,84	5,85	8,25 ± 0,48	11,61	17,88 ± 1,04	5,83	16,22 ± 0,98	18,18
RM46	37,25 ± 1,23	3,31	6,00 ± 0,33	5,03	23,50 ± 1,15	4,89	18,63 ± 0,84	4,53
RM47	37,08 ± 1,05	2,84	5,80 ± 0,25	4,30	32,83 ± 3,02	9,18	25,83 ± 1,60	6,19
RM48	45,20 ± 1,38	3,05	4,85 ± 0,15	3,17	18,30 ± 0,96	5,22	13,60 ± 0,65	4,80
RM49	32,20 ± 2,67	8,30	5,60 ± 0,40	7,14	19,00 ± 3,33	17,54	14,20 ± 2,01	14,15
L18	34,79 ± 1,73	4,66	8,00 ± 0,52	5,81	20,33 ± 2,04	8,04	18,78 ± 1,10	17,62

Thế hệ thứ Ba trồng vụ Thu Đông, năm 2009, tại Tổ Rừng Vầu, Phường Quang Vinh, Thành phố Thái Nguyên

3.2.2. Đánh giá các dòng chọn lọc ở thế hệ thứ Năm

Các dòng chọn lọc ở thế hệ thứ Năm trồng vụ Thu Đông năm 2010. Ở thế hệ thứ Năm, lượng quả và hạt đủ lớn để thực hiện các thí nghiệm liên quan đến việc đánh giá khả năng chịu hạn của các dòng chọn lọc. Chúng tôi tiếp tục đánh giá các dòng chọn lọc ở thế hệ thứ Năm thông qua việc phân tích một số đặc điểm nông sinh học; xác định các yếu tố cấu thành năng suất như khối lượng 100 quả, khối lượng 100 hạt; đánh giá chất lượng hạt trên phương diện hóa sinh thông qua xác định hàm lượng protein, hàm lượng lipid; đánh giá khả năng chịu hạn ở giai đoạn hạt nảy mầm, giai đoạn cây non và sự sai khác trong hệ gen bằng kỹ thuật RAPD.

3.2.2.1. Đặc điểm nông sinh học và chất lượng hạt

Kết quả đánh giá sự ổn định các tính trạng nông học của một số dòng chọn lọc ở thế hệ thứ Năm được trình bày ở bảng 3.10.

Bảng 3.10 cho thấy, các chỉ tiêu nông sinh học và chất lượng hạt có sự biến động thấp, trong khoảng 1,14% đến 7,88%. Sự ổn định biểu hiện của các tính trạng này một lần nữa khẳng định sử dụng kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật góp phần rút ngắn thời gian chọn dòng.

Ở thế hệ thứ Năm, khối lượng 100 quả lạc của các dòng chọn lọc dao động từ 83,11g đến 145,12g. Có 5/7 dòng có khối lượng 100 quả ở mức quá to (107,05g – 145,12g), chiếm 71,43%. Ba dòng gồm R44, R46, RM46 có khối lượng 100 quả cao hơn so với giống gốc (cao hơn 116,59g).

Khối lượng 100 hạt của các dòng chọn lọc ở thế hệ thứ Năm dao động trong khoảng 41,11g đến 56,27g, các dòng chọn lọc có khối lượng 100 quả lớn cũng là dòng có khối lượng 100 hạt cao.

Bảng 3.10. Đặc điểm nông sinh học và chất lượng hạt các dòng chọn lọc ở thế hệ thứ Năm

(\bar{X} : Giá trị trung bình; $S_{\bar{X}}$: Sai số trung bình mẫu; Cv% : Hệ số biến động)

Chi tiêu theo dõi	Cao thân chính (cm)		Số nhánh/cây		Số quả/cây		Số quả chắc/cây		Khối lượng 100 quả (g)		Khối lượng 100 hạt (g)		Hàm lượng protein (% KLK)	Hàm lượng lipid (% KLK)
	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	Cv%	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	Cv%	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	Cv%	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	Cv%	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	Cv%	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	Cv%	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$
R44	45,62 ± 0,76	1,66	6,50 ± 0,18	2,88	23,36 ± 1,19	5,07	17,25 ± 1,25	7,23	121,33 ± 2,54	2,10	49,23 ± 0,89	1,80	32,33 ± 3,28	38,11 ± 0,89
R46	45,77 ± 0,79	1,72	5,77 ± 0,20	3,49	19,15 ± 0,69	3,59	13,08 ± 0,63	4,84	145,12 ± 5,05	3,48	56,27 ± 1,32	2,34	32,08 ± 2,54	34,67 ± 0,77
R48	48,08 ± 0,85	2,20	5,20 ± 0,20	3,85	15,64 ± 0,96	6,16	11,75 ± 0,59	5,04	83,11 ± 3,10	3,72	44,07 ± 3,47	7,88	26,58 ± 2,04	36,44 ± 0,89
RM46	43,27 ± 0,77	1,78	5,80 ± 0,20	3,45	20,22 ± 1,26	5,06	13,26 ± 2,76	5,74	120,95 ± 9,42	7,79	52,40 ± 0,78	1,48	29,09 ± 2,29	38,22 ± 2,70
RM47	41,63 ± 0,54	1,30	4,73 ± 0,19	4,12	27,72 ± 1,31	4,70	19,44 ± 1,38	7,07	103,43 ± 4,46	4,31	41,11 ± 2,50	6,08	38,97 ± 4,25	36,89 ± 0,89
RM48	35,46 ± 1,02	2,88	5,67 ± 0,22	3,97	27,08 ± 1,84	6,78	14,55 ± 0,99	6,84	108,27 ± 6,98	6,45	46,53 ± 2,89	6,21	27,72 ± 1,96	38,67 ± 0,88
RM49	31,47 ± 1,13	3,59	6,53 ± 0,57	4,19	22,33 ± 1,18	5,29	12,69 ± 0,40	3,14	107,05 ± 1,80	1,68	45,00 ± 3,52	7,82	25,72 ± 2,89	38,22 ± 0,44
L18	30,62 ± 0,84	2,73	7,69 ± 0,29	3,72	26,80 ± 1,22	4,55	14,45 ± 0,78	5,39	116,59 ± 2,84	2,43	47,81 ± 0,55	1,14	34,47 ± 2,85	36,00 ± 2,67

Thế hệ thứ Năm trồng vụ Thu Đông, năm 2010, tại Tổ Rừng Vầu, Phường Quang Vinh, Thành phố Thái Nguyên

Sự biến động về chỉ tiêu quả và hạt của cây trong quần thể thí nghiệm ở mức thấp (mức biến động là $Cv = 1,14\% - 7,88\%$).

Hàm lượng lipid trong hạt là một đặc trưng của giống. Đặc biệt, cây lạc là cây công nghiệp lấy dầu, sự tích lũy dầu đạt tối đa nếu thu hoạch đúng độ chín [8]. Các dòng chọn lọc thế hệ thứ Năm có hàm lượng lipid từ 34,67% khối lượng khô (KLK) đến 38,67% KLK. Dòng có hàm lượng lipid cao nhất là RM48, thấp nhất là dòng R46.

Hàm lượng protein trong hạt không chỉ phản ánh chất lượng hạt mà còn liên quan đến khả năng chống chịu của cây trồng. Các dòng chọn lọc thế hệ thứ Năm có hàm lượng protein khoảng từ 25,72% KLK đến 38,97% KLK. Dòng có hàm lượng protein cao nhất là RM47, thấp nhất là dòng RM49.

Căn cứ vào kết quả nghiên cứu về đặc điểm nông sinh học, chất lượng hạt của các dòng lạc chọn lọc có nguồn gốc từ mô sẹo chịu mất nước và mô sẹo chịu ảnh hưởng chiếu xạ kết hợp với xử lý gây mất nước, chúng tôi chọn được một số dòng có đặc điểm nổi bật, bao gồm: (1) Dòng R46 có khối lượng 100 quả và hạt cao; (2) Dòng RM47 có hàm lượng protein cao; (3) Dòng RM48 là dòng có hàm lượng lipid cao.

Trong cùng một điều kiện trồng trọt như nhau, các dòng chọn lọc có sự thay đổi về kiểu hình, đó là lý do để chúng tôi tiếp tục nghiên cứu sự thay đổi ở mức phân tử.

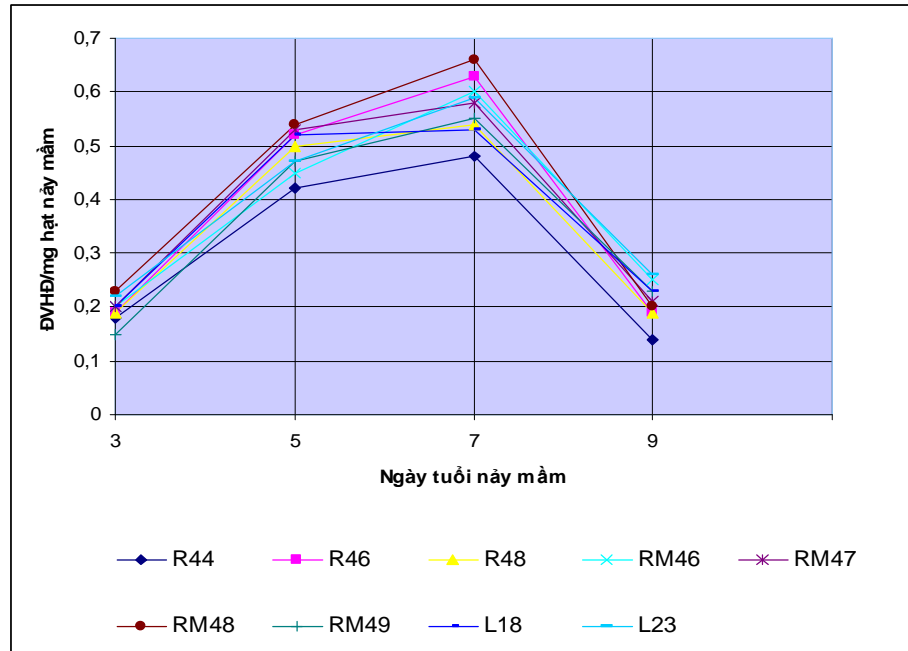
3.2.2.2 Kết quả đánh giá khả năng chịu hạn

Khả năng chịu hạn của thực vật nói chung và của cây lạc nói riêng là một tính trạng khó kiểm soát ở ngoài đồng ruộng. Do vậy, chúng tôi tiến hành đánh giá khả năng chịu hạn của các dòng lạc chọn lọc thế hệ thứ Năm ở giai đoạn hạt nảy mầm và giai đoạn cây non. Kết quả đánh giá được thực hiện

đồng thời với giống gốc và giống L23 có khả năng chịu hạn tốt nhất trong 10 giống lạc nghiên cứu.

Khả năng chịu hạn ở giai đoạn hạt nảy mầm

Đánh giá khả năng chịu hạn của giống lạc L18, L23 và các dòng lạc chọn lọc, chúng tôi lựa chọn phương pháp gây hạn sinh lý ở giai đoạn hạt nảy mầm bằng cách xử lý hạt bằng dung dịch sorbitol 7% để nghiên cứu. Ở giai đoạn hạt nảy mầm, các chất trong hạt chuyển trạng thái từ ít hoạt động sang giai đoạn hoạt động mạnh mẽ, nhiều enzyme mới được tổng hợp, trong đó có α -amylase. Sự tăng hoạt độ của α -amylase làm tăng hàm lượng đường do tinh bột bị thủy phân. Khả năng chịu hạn của giống lạc L18, L23 và các dòng chọn lọc được chúng tôi đánh giá thông qua xác định hoạt độ α -amylase và hàm lượng đường. Kết quả nghiên cứu trình bày ở phụ lục 6, hình 3.6 và hình 3.7.



Hình 3.6. Sự biến động về hoạt độ của α -amylase trong điều kiện hạn sinh lý

Kết quả nghiên cứu cho thấy, dưới tác động của hạn sinh lý, sự biến động hoạt độ α -amylase của giống lạc L18, L23 và các dòng chọn lọc có sự sai khác nhau đáng kể. Ở giai đoạn 3 ngày tuổi, hoạt độ của α -amylase dao động trong khoảng từ 0,15 ĐVHĐ/mg hạt nảy mầm đến 0,23 ĐVHĐ/mg hạt nảy mầm. Xử lý hạt bằng sorbitol 7% để gây hạn sinh lý, hoạt độ của α -amylase có xu hướng tăng từ 3 ngày tuổi đến 7 ngày tuổi sau đó giảm dần ở giai đoạn 9 ngày tuổi.

Giống có hoạt độ của α -amylase cao nhất ở ngày nảy mầm thứ 7 là RM48 (0,66 ĐVHĐ/mg hạt nảy mầm). Cũng ở ngày nảy mầm thứ 7, hoạt độ của α -amylase cao thứ 2 là dòng R46 (0,63 ĐVHĐ/mg hạt nảy mầm), sau đó là của giống L23 (0,59 ĐVHĐ/mg hạt nảy mầm). Dòng có hoạt độ của α -amylase thấp ở ngày nảy mầm thứ 7 là R44 (0,48 ĐVHĐ/mg hạt nảy mầm).

Khả năng hoạt động của α -amylase trong điều kiện bị hạn phụ thuộc vào khả năng chịu hạn của cây lạc. Căn cứ vào hoạt độ của α -amylase ở giai đoạn 7 ngày tuổi, chúng tôi xếp giống lạc L18, L23 và các dòng chọn lọc theo mức độ chịu hạn thành 4 nhóm:

(1) Nhóm 1: có 3 dòng (RM48, R46, RM46), hoạt độ của α -amylase trong khoảng 0,60-0,66 ĐVHĐ/mg hạt nảy mầm.

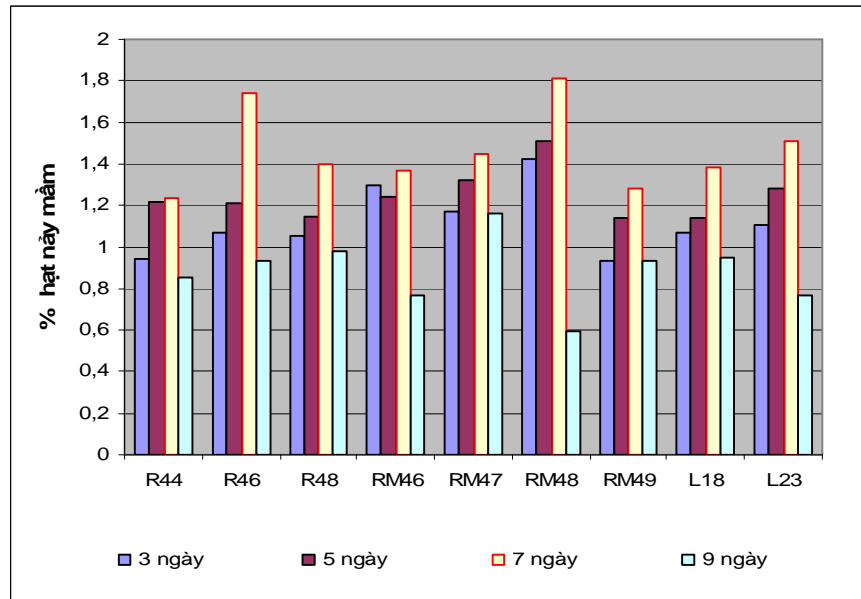
(2) Nhóm 2: hoạt độ của α -amylase trong khoảng 0,58-0,59 ĐVHĐ/mg hạt nảy mầm, gồm có giống L23 và dòng RM47.

(3) Nhóm 3: có 2 dòng (RM49, R48) và giống L18, có hoạt độ của α -amylase trong khoảng 0,50-0,55 ĐVHĐ/mg hạt nảy mầm.

(4) Nhóm 4: có 1 dòng (R44), hoạt độ của α -amylase đạt 0,48 ĐVHĐ/mg hạt nảy mầm.

Đường trong cơ thể thực vật là nhóm chất liên quan đến sự điều hòa áp suất thẩm thấu của tế bào khi gặp điều kiện cực đoan [50].

Xác định hàm lượng đường trong hạt nảy mầm của giống lạc L18, L23 và các dòng chọn lọc bằng phương pháp vi phân tích, chúng tôi nhận thấy tất cả các dòng và giống lạc nghiên cứu đều có quy luật biến động hàm lượng đường tăng từ khi hạt nảy mầm đến giai đoạn hạt nảy mầm 7 ngày tuổi, sau đó giảm dần (phụ lục 6 và hình 3.7)



Hình 3.7. Sự biến động của hàm lượng đường trong điều kiện hạn sinh lý

Theo quan điểm hiện nay, việc tích lũy các chất hòa tan trong tế bào đồng nhất với khái niệm điều chỉnh áp suất thẩm thấu. Đây là phương thức thích nghi của cơ thể thực vật đối với các yếu tố bất lợi của môi trường. Khi tế bào mất nước, các chất hòa tan sẽ được tích lũy dần để chống lại sự mất nước đồng thời tăng khả năng giữ nước của chất nguyên sinh. Quá trình thủy phân

polysaccharid dự trữ là nguồn cung cấp chất tan cho quá trình điều chỉnh áp suất thẩm thấu của tế bào khi bị mất nước đồng thời góp phần thúc đẩy quá trình phục hồi cây [50], [51]. Hàm lượng đường được tạo thành nhiều nhất ở 7 ngày tuổi theo thứ tự giảm dần của các giống và dòng chọn lọc là: RM48>R46>L23>RM47>R48>L18>RM46>RM49>R44.

Trong điều kiện bất lợi (hạn, lạnh, nóng...), kết quả nghiên cứu trên cây thuốc lá của Nguyễn Hoàng Lộc (1992) và ở cây lúa của Nguyễn Thị Tâm và đtg (2003) cho thấy có sự gia tăng hàm lượng đường [13], [27]. Tuy nhiên, trong điều kiện bất lợi thì hoạt độ của α -amylase, hàm lượng đường cũng chỉ tăng ở một tỷ lệ nhất định và phụ thuộc vào khả năng chịu hạn của cây.

Bảng 3.11. Tương quan giữa hoạt độ của α -amylase và hàm lượng đường ở giai đoạn hạt nảy mầm

STT	Giống và dòng chọn lọc	Phương trình hồi quy	Hệ số tương quan
1	R44	$1,13x + 0,72$	0,9881
2	R46	$1,61x + 0,57$	0,8972
3	R48	$1,04x + 0,77$	0,8379
4	RM46	$1,83x + 0,34$	0,9811
5	RM47	$0,54x + 1,04$	0,9945
6	RM48	$2,66x + 0,66$	0,9999
7	RM49	$1,04x + 0,68$	0,9862
8	L18	$1,07x + 0,70$	0,8466
9	L23	$2,26x + 0,19$	0,9983

Phân tích mối tương quan giữa sự biến động hoạt độ của α -amylase và hàm lượng đường của giống lạc L18, L23 và các dòng chọn lọc ở giai đoạn hạt nảy mầm khi bị hạn sinh lý cho thấy, hàm lượng đường phụ thuộc tuyến tính vào hoạt độ α -amylase, với hệ số tương quan (R) dao động từ 83,79% đến 99,99%. Hoạt độ của α -amylase cao sẽ làm quá trình phân giải tinh bột thành đường xảy ra mạnh mẽ, đảm bảo cung cấp chất dinh dưỡng cho quá trình nảy mầm của hạt, đặc biệt là điều chỉnh áp suất thẩm thấu của tế bào trong điều kiện cực đoan. Sự sai khác về hoạt độ của α -amylase và đường ở các dòng, giống lạc trong các thời điểm hạt nảy mầm khác nhau liên quan đến khả năng chịu hạn của chúng. Dòng chọn lọc có hoạt độ của α -amylase và hàm lượng đường cao hơn giống gốc đã minh chứng cho hiệu quả cải thiện khả năng chịu hạn của cây bằng kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật.

Khả năng chịu hạn ở giai đoạn cây non

Kết quả đánh giá khả năng chịu hạn ở giai đoạn cây non của các dòng chọn lọc thế hệ thứ Năm được trình bày ở bảng 3.12 và hình 3.7 .

Theo dõi tỷ lệ cây sống sót, cây phục hồi ở thời điểm 1 đến 5 ngày hạn, bảng 3.12 cho thấy, các dòng lạc có chỉ số chịu hạn tương đối khác nhau, dao động từ 3672,48 đến 10089,20. Dòng RM48 có chỉ số chịu hạn cao nhất (10089,20%), sau đó đến dòng R46 và giống lạc L23, thấp nhất là các dòng R44, RM49 và giống gốc L18.

Trong 7 dòng lạc chọn lọc và giống gốc L18 có 5 dòng chọn lọc có chỉ số chịu hạn tương đối cao, trong đó 2 dòng có nguồn gốc từ mô sẹo chịu thời khô (R46; R48) và 3 dòng có nguồn gốc từ mô sẹo chịu ảnh hưởng của chiếu xạ kết hợp với thời khô (RM46; RM47; RM48).

Bảng 3.12. Tỷ lệ cây sống, cây phục hồi và chỉ số chịu hạn tương đối của các dòng chọn lọc ở thế hệ thứ Năm

Dòng, giống gốc	% CKH sau 1 ngày hạn	% CKH sau 3 ngày hạn	% CKH sau 5 ngày hạn	% CHP sau 1 ngày hạn	% CHP sau 3 ngày hạn	% CHP sau 5 ngày hạn	Chỉ số chịu hạn tương đối	Xếp thứ tự
R44	78,6	57,3	36,7	14,3	14,3	28,6	4327,07	4
R46	70,8	50,0	20,8	53,8	57,7	69,2	7662,38	2
R48	73,3	53,3	26,7	20,0	46,7	53,3	5713,17	3
RM46	54,6	36,4	18,2	41,7	50,0	58,3	5019,50	3
RM47	95,8	75,0	20,8	16,0	20,0	24,0	5272,80	3
RM48	90,0	80,0	20,0	50,0	60,0	70,0	10089,20	1
RM49	62,5	30,8	7,7	21,7	39,1	52,2	3672,48	4
L18	66,7	50,0	30,3	16,7	33,3	50,0	4725,09	4
L23	72,8	51,5	25,8	50,8	57,0	69,0	7898,30	2

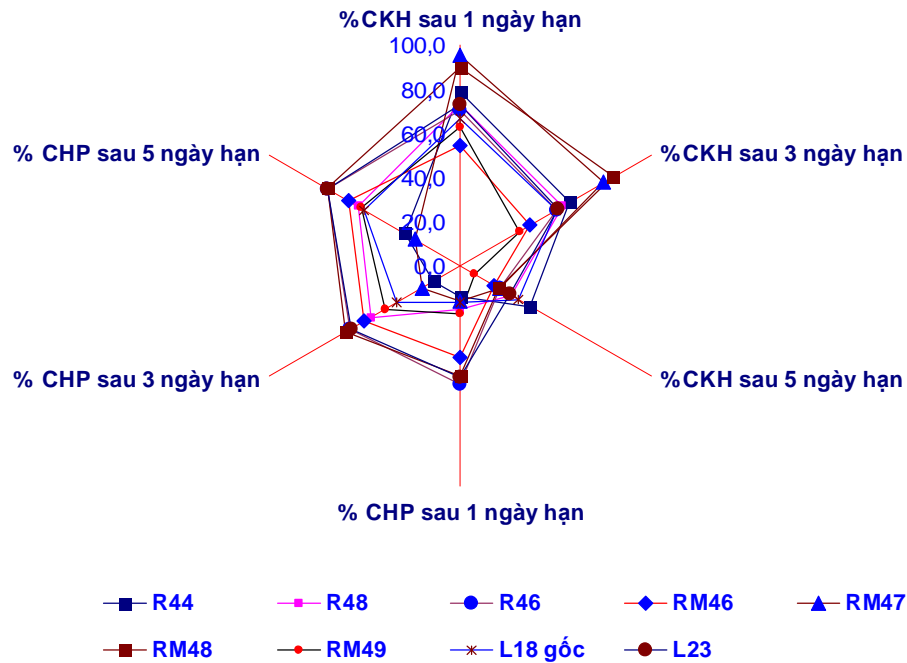
Căn cứ vào chỉ số chịu hạn tương đối của các dòng chọn lọc và giống gốc L18 (bảng 3.12 và hình 3.8) có thể xếp các dòng chọn lọc và giống gốc ở 4 mức chịu hạn khác nhau.

Mức 1: có chỉ số chịu hạn tương đối trên 10000 (có một dòng RM48);

Mức 2: chỉ số chịu hạn tương đối trên 7000; có dòng R46, giống L23;

Mức 3: chỉ số chịu hạn tương đối từ 5000 đến 6000 có các dòng: R48, RM46, RM47;

Mức 4: chỉ số chịu hạn tương đối nhỏ hơn 5000 gồm giống gốc L18, dòng R44 và dòng RM49.



Hình 3.8. Đồ thị hình rada biểu thị sự khác nhau về khả năng chịu hạn của các dòng lạc chọn lọc, giống L18 và giống L23

Các dòng lạc chọn lọc có nguồn gốc từ mô sẹo chịu thời khô và mô sẹo chịu chiếu xạ kết hợp với thời khô gây mất nước đã có sự khác nhau về một số đặc điểm nông sinh học, đặc điểm hóa sinh hạt và khả năng chịu hạn. Bản chất của các thay đổi này liên quan đến hệ gen như thế nào đó là lý do chúng tôi tiếp tục phân tích sự sai khác ở mức phân tử của các dòng chọn lọc và giống gốc.

3.2.2.3. *Kết quả so sánh sự sai khác về hệ gen của các dòng chọn lọc và giống gốc*

Với mục tiêu nghiên cứu sự thay đổi hệ gen giữa các dòng lạc chọn lọc ở thế hệ thứ 5 so với giống gốc, chúng tôi tiến hành tách chiết DNA từ hệ gen cây lạc và phân tích đa hình DNA bằng kỹ thuật RAPD.

Kết quả tách chiết DNA tổng số

Lá non của các dòng lạc được sử dụng để tách chiết DNA. Sau khi tách chiết và tinh sạch, hàm lượng và độ sạch DNA được xác định bằng phương pháp đo quang phổ hấp thụ ở bước sóng 260nm và 280nm. Đồng thời, DNA tổng số được điện di trên gel agarose 1% và chụp ảnh trên máy soi gel để đánh giá chất lượng dung dịch DNA. Kết quả thu nhận hàm lượng DNA tách được từ 0,5g lá lạc non trong khoảng từ 462 μ g/ml đến 1693 μ g/ml.

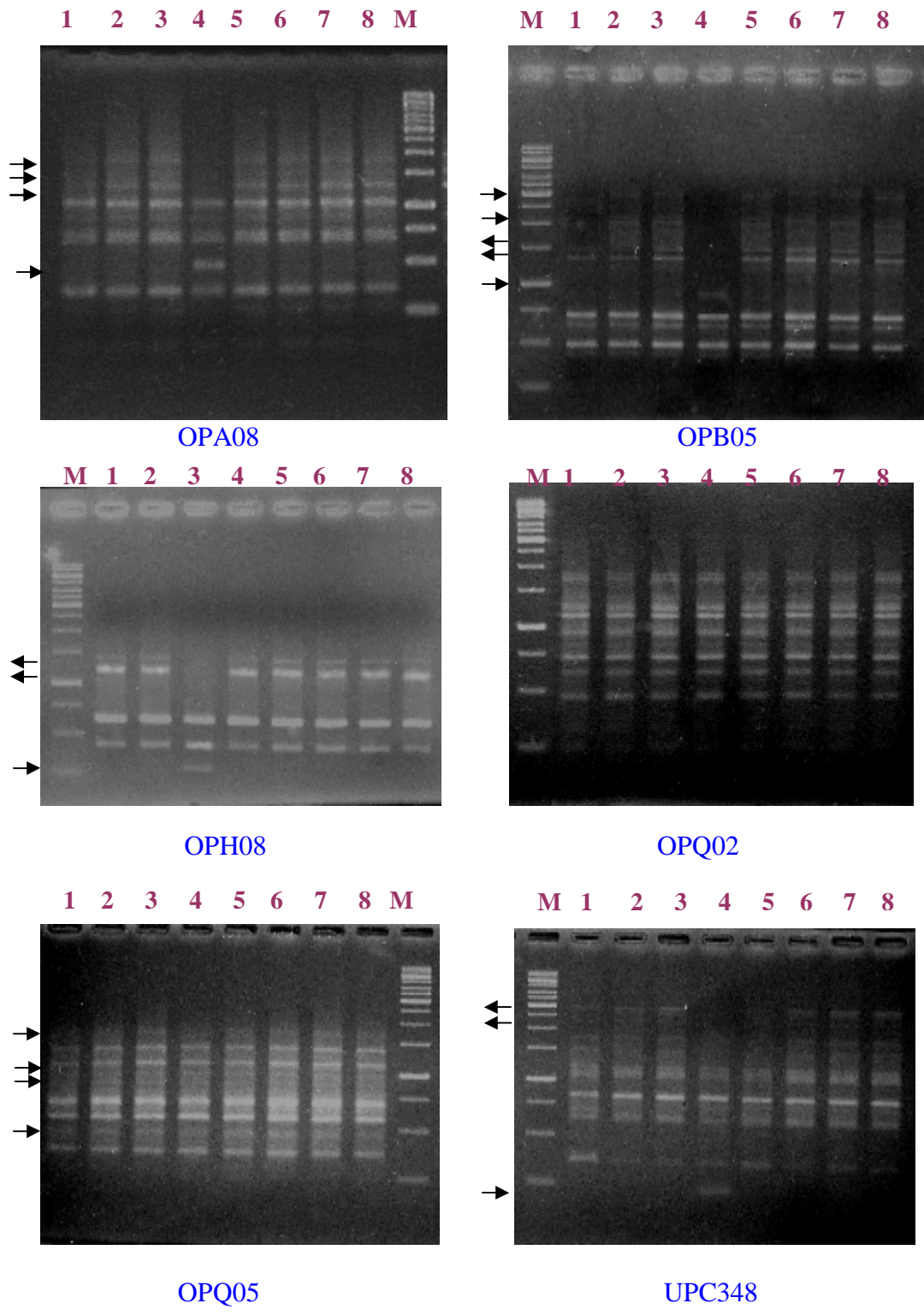
Tỷ số OD_{260nm} / OD_{280nm} lớn hơn 1,8. Hình ảnh DNA trên gel sắc nét và gọn, đảm bảo chất lượng để thực hiện các kỹ thuật sinh học phân tử tiếp theo (hình ảnh không trình bày).

Kết quả phân tích đa hình DNA bằng kỹ thuật RAPD

Phân tích tính đa hình của DNA dựa trên sự xuất hiện hay không xuất hiện các phân đoạn có cùng kích thước được khuếch đại từ hệ gen nhờ sự thay đổi các điểm gắn của các mồi trong phản ứng RAPD [16], [129].

Phản ứng RAPD được thực hiện với 25 mồi ngẫu nhiên có chiều dài 10 nucleotide (phụ lục 2). Kết quả phân tích thu được tổng số 1254 phân đoạn, với kích thước ước đoán của các phân đoạn trong khoảng từ 0,2kb đến 4,2kb.

Tính toán kết quả của thí nghiệm với 25 mồi nghiên cứu (bảng 3.13), chúng tôi nhận thấy, phản ứng RAPD với 25 mồi làm xuất hiện trong 7 dòng và giống gốc từ 16 phân đoạn đến 110 phân đoạn DNA. Có 7 mồi (OPA05, OPA10, OPA13, OPH04, OPF09, OPN05, OPQ02) cho kết quả đơn hình, hai mồi (OPA13 và OPF09) chỉ xuất hiện 2 băng vạch đơn hình trên cả 7 dòng và giống gốc. Mồi có số phân đoạn nhiều nhất là OPA04, với 110 phân đoạn DNA. Hình 3.9 trình bày hình ảnh điện di sản phẩm RAPD với một số mồi, trong đó các băng xuất hiện và biến mất được so sánh với giống gốc.



Hình 3.9. Hình ảnh điện di sản phẩm RAPD với một số môi

← Băng biến mất → Băng mới xuất hiện
M: Marker chuẩn;

1.L18 2.RM46 3.RM47 4.RM48 5.RM49 6.R44 7.R46 8.R48

Bảng 3.13. Số phân đoạn DNA nhân bản ngẫu nhiên và tỷ lệ phân đoạn đa hình của 25 môi trong phản ứng RAPD

TT	Ký hiệu môi	Số phân đoạn DNA			Tỷ lệ đoạn đa hình (%)	TT	Ký hiệu môi	Số phân đoạn DNA			Tỷ lệ đoạn đa hình (%)
		Tổng số	Đơn hình	Đa hình				Tổng số	Đơn hình	Đa hình	
1	OPA01	82	64	18	21,95	14	OPA14	36	24	12	33,33
2	OPA02	63	56	7	11,11	15	OPA15	44	31	13	29,55
3	OPA03	63	56	7	11,11	16	OPB05	59	32	27	45,76
4	OPA04	110	104	6	5,45	17	OPB10	21	16	5	23,81
5	OPA05	64	64	0	0,00	18	OPH04	24	24	0	0,00
6	OPA06	62	48	14	22,58	19	OPH08	31	16	15	48,39
7	OPA07	29	28	1	3,45	20	OPF09	16	16	0	0,00
8	OPA08	48	28	20	41,67	21	OPF10	46	32	14	30,43
9	OPA09	77	64	13	16,88	22	OPN05	64	64	0	0,00
10	OPA10	40	40	0	0,00	23	OPQ02	64	64	0	0,00
11	OPA11	31	24	7	22,58	24	OPQ05	68	40	28	41,18
12	OPA12	41	8	33	80,49	25	UPC348	55	40	15	27,27
13	OPA13	16	16	0	0,00	Tổng cộng		1254	999	255	20,33

Tổng số phân đoạn đa hình là 255 phân đoạn, chiếm 20,33% số phân đoạn được nhân bản. Tỷ lệ phân đoạn đa hình cao nhất ở môi OPA12 với 33/41 phân đoạn được nhân lên, chiếm 80,49%.

Dựa trên sự xuất hiện hay không xuất hiện các phân đoạn khi thống kê kết quả điện di sản phẩm RAPD trên gel agarose 1% để thiết lập mối quan hệ di truyền của các dòng chọn lọc so với giống gốc ở mức độ phân tử. Kết quả nghiên cứu được trình bày ở bảng 3.14 và hình 3.10.

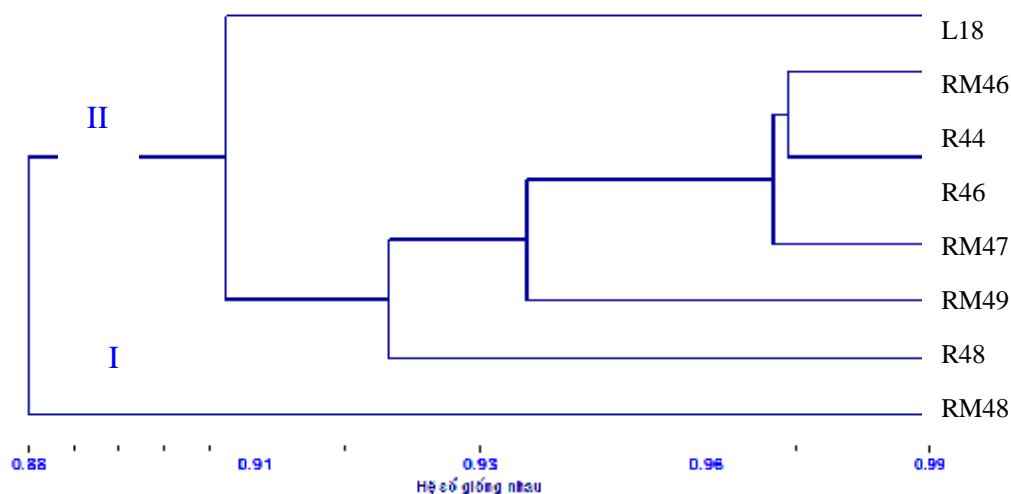
Bảng 3.14. Tỷ lệ sai khác về hệ gen của các dòng chọn lọc và giống gốc L18 (%)

	R44	R46	R48	RM46	RM47	RM48	RM49	L18
R44	0,000							
R46	6,061	0,000						
R48	3,752	3,146	0,000					
RM46	1,521	1,540	4,807	0,000				
RM47	1,522	1,531	4,757	1,844	0,000			
RM48	6,043	5,437	9,143	6,464	6,405	0,000		
RM49	3,420	2,814	4,898	3,147	3,757	6,573	0,000	
L18	5,069	4,762	3,875	3,805	5,066	8,002	6,536	0,000

Bảng 3.14 là kết quả so sánh về tỷ lệ sai khác ở mức phân tử về hệ gen của các dòng chọn lọc so với nhau và so với giống gốc. Kết quả cho thấy, 8 hệ gen có tỷ lệ sai khác từ 1,521% đến 9,143%. Mức độ sai khác lớn nhất giữa

hệ gen của dòng RM48 với hệ gen của dòng R48 (tỷ lệ sai khác là 9,143%). Hai dòng chọn lọc có hệ gen giống nhau nhất là RM46 và R44 (tỷ lệ sai khác nhỏ nhất với 1,521%)

Thiết lập mối quan hệ của 7 dòng chọn lọc và giống gốc ở mức phân tử dựa trên số liệu đa hình RAPD với 25 môi ngẫu nhiên được thể hiện ở sơ đồ hình 3.10.



Hình 3.10. Sơ đồ mô tả mối quan hệ của 7 dòng chọn lọc với giống gốc L18 ở mức phân tử

Hình 3.10 cho thấy, 7 dòng chọn lọc đều có sự sai khác về hệ gen so với giống gốc L18. Sơ đồ mô tả mối quan hệ của các dòng chọn lọc và giống gốc được phân bố thành 2 nhóm với khoảng cách di truyền là 12% ($1 - 0,88$). Nhóm I: Chỉ có một dòng RM48, đây là dòng có nguồn gốc từ mô sẹo chịu tác động kết hợp giữa chiếu xạ và thối khô, có khoảng cách di truyền so với các dòng còn lại và giống gốc ở nhánh 2 là 12%.

Nhóm II: gồm các dòng R48, RM49, RM47, R46, R44, RM46 và giống gốc L18. Khoảng cách di truyền của các dòng chọn lọc và giống gốc L18 là 9,5% ($1 - 0,905 = 0,095$). Nhóm II chia làm hai nhánh, nhánh thứ nhất là

giống gốc (L18); nhánh thứ hai, chia thành nhiều nhánh nhỏ bao gồm các dòng chọn lọc còn lại, trong đó hai dòng R44, R46 cùng có nguồn gốc từ mô sẹo chịu thời khô làm mất nước. Hai dòng này có độ sai khác so với giống gốc ở mức thấp 1,521% và 1,522%.

Hệ số đa dạng di truyền và các phân đoạn DNA đặc trưng của các dòng chọn lọc

Căn cứ vào tần suất xuất hiện các alen trong từng locus, sử dụng công thức tính hệ số đa dạng di truyền (Genetic Diversity Index) dựa trên các dữ liệu phân tích RAPD, chúng tôi đã xác định được hệ số đa dạng di truyền (H_{RAPD}) của 7 dòng chọn lọc trong phạm vi 25 môi ngẫu nhiên.

Kết quả tính toán cho thấy các dòng chọn lọc biểu hiện sự đa dạng di truyền ở mức phân tử với hệ số $H_{RAPD} = 11,09\%$. Đây chính là nguồn gen phong phú cung cấp cho chọn dòng ở lạc.

Bảng 3.15. Chỉ thị RAPD đặc trưng của các dòng lạc chọn lọc

Dòng lạc chọn lọc	OPA07	OPA08	OPB05	UPC348	OPH08
R44	-	-	-	-	-
R46	-	-	-	-	-
R48	-	-	-	-	-
RM46	-	-	-	-	-
RM47	-	-	-	-	250bp
RM48	750bp	500bp	900bp	200bp	-
RM49	-	-	-	-	-

Kết quả nghiên cứu ở bảng 3.15 cho thấy, dòng RM48 xuất hiện 4 kích thước đặc trưng với 4 mồi. Trong đó, mồi OPA07 kích thước đặc trưng xuất hiện ở 750bp (RM48/OPA07-750bp); mồi OPA08 kích thước đặc trưng xuất hiện ở 500bp (RM48/OPA08-500bp); mồi OPB05 có kích thước đặc trưng ở 900bp (RM48/OPB05-900bp); mồi UPC348 kích thước đặc trưng xuất hiện ở 200bp (RM48/UPC348-200bp). Mồi OPH08 xuất hiện một đặc trưng ở kích thước 250bp với dòng RM47 (RM47/OPH08-250bp). Như vậy, sử dụng 25 mồi trong phản ứng RAPD để nhận bản các phân đoạn DNA từ hệ gen của 7 dòng lạc có nguồn gốc từ mô sẹo sau khi xử lý bởi thối khô và chiếu xạ kết hợp với thối khô đã xác định được 5 chỉ thị phân tử RAPD đặc trưng ở 2 dòng lạc chọn lọc với 5 mồi ngẫu nhiên (OPA07, OPA08, OPB05, UPC348, OPH08).

Đánh giá các dòng chọn lọc thông qua phân tích một số đặc điểm nông học, chỉ tiêu năng suất, chất lượng hạt và khả năng chịu hạn ở thế hệ thứ Năm, chúng tôi đã tuyển chọn được 3 dòng ưu việt để tiếp tục đánh giá, theo dõi, bồi dưỡng để giới thiệu khảo nghiệm giống. Đó là các dòng:

(1) Dòng RM48 có khả năng chịu hạn cao nhất, hàm lượng lipid cao nhất (đạt 38,67% KLK);

Dòng R46 có khả năng chịu hạn cao thứ hai và có khối lượng 100 quả, 100 hạt cao (145,12g/100 quả; 56,27g/100 hạt);

Dòng RM47 có có khả năng chịu hạn cao, hàm lượng protein lớn nhất (đạt 38,97% KLK).

3.2.3. Đặc điểm của một số dòng lạc ưu việt

Tập hợp các kết quả phân tích về đặc điểm nông sinh học, chất lượng hạt, khả năng chịu hạn và đặc điểm sinh học phân tử của các dòng chọn lọc có nguồn gốc từ mô sẹo chịu thối khô và mô sẹo chịu chiếu xạ kết hợp với thối khô của giống L18 được trình bày ở bảng 3.16 và hình 3.11.

Bảng 3.16. Một số đặc điểm của 3 dòng chọn lọc và giống L18

Đặc điểm	RM48	RM47	R46	L18
Nguồn gốc	Cây tái sinh từ mô sẹo chịu chịu chiếu xạ + thời khô	Cây tái sinh từ mô sẹo chịu chịu chiếu xạ + thời khô	Cây tái sinh từ mô sẹo chịu thời khô	Nhập từ Trung Quốc, năm 2004
Chiều cao cây (cm)	35,46 ± 1,02	41,63 ± 0,54	45,77 ± 0,79	30,62 ± 0,84
Khối lượng 100 quả (g)	108,27 ± 6,98	103,43 ± 4,46	145,12 ± 5,05	116,59 ± 2,84
Khối lượng 100 hạt (g)	46,53 ± 2,89	41,11 ± 2,50	56,27 ± 1,32	47,81 ± 0,55
Hàm lượng protein (% KLK)	27,72 ± 1,96	38,97 ± 4,25	32,08 ± 2,54	34,47 ± 2,85
Hàm lượng lipid (% KLK)	38,67 ± 0,88	36,89 ± 0,89	34,67 ± 0,77	36,00 ± 2,67
Chỉ số chịu hạn	10089,20	5272,80	7662,38	4725,09
Chỉ thị RAPD đặc trưng	RM48/OPA07-750bp; RM48/OPA08-500bp; RM48/OPB05-900bp; RM48/UPC348-200bp; RM47/OPH08-250bp;			



RM48



RM48



RM47



RM47



R46



R46



L18



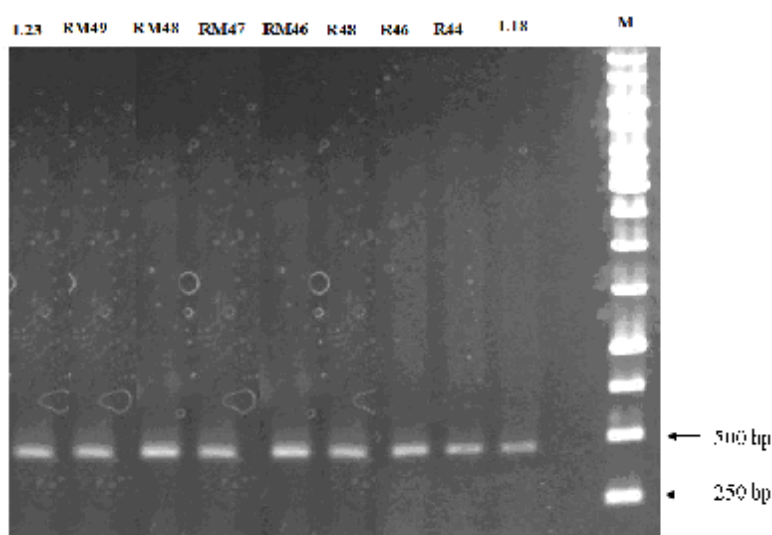
L18

Hình 3.11. Hình ảnh quả và hạt của các dòng chọn lọc ở thế hệ thứ Năm

3.3. PHÂN LẬP VÀ XÁC ĐỊNH TRÌNH TỰ GEN CYSTATIN TỪ CÂY LẠC

3.3.1. Khuếch đại gen cystatin từ DNA hệ gen của cây lạc

Sau khi tách chiết DNA tổng số, tinh sạch và pha về nồng độ thích hợp, chúng tôi đã tiến hành nhân bản gen cystatin bằng phương pháp PCR với DNA của 7 dòng chọn lọc, của giống L18, và giống L23. Kết quả nhân gen được kiểm tra trên gel agarose 1% cùng với marker (hình 3.12).



Hình 3.12. Hình ảnh điện di sản phẩm nhân gen cystatin từ cây lạc

Sản phẩm của phản ứng PCR thu được ở hình 3.12 cho thấy, chỉ có 1 băng DNA, kích thước khoảng gần 500 bp, phù hợp với tính toán lý thuyết về kích thước gen cystatin được phân lập từ mRNA do nhóm tác giả Yan công bố (2004) [134]. Do đó, chúng tôi hy vọng rằng, kết quả của phản ứng PCR với cặp mồi Cys-AraF/Cys-AraR được nhân lên từ DNA hệ gen của giống lạc L18, L23 và 7 dòng lạc chọn lọc là sự có mặt của gen cystatin trong hệ gen cây lạc. Tuy nhiên, để khẳng định chính xác sản phẩm được khuếch đại từ hệ gen là gen cystatin phải thực hiện tách dòng, xác định trình tự và so sánh với trình tự gen cystatin đã công bố.

Chúng tôi tiến hành tách dòng và xác định trình tự gen cystatin của 2 dòng R46, RM48 (2 dòng có khả năng chịu hạn cao nhất), giống gốc L18 (khả năng chịu hạn kém) và giống L23 (có khả năng chịu hạn tốt) nhằm mục đích so sánh trình tự gen của các dòng và giống này.

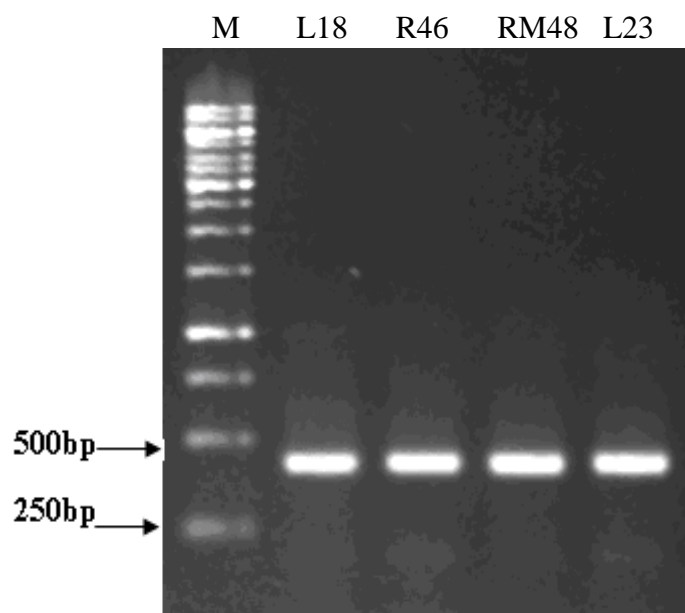
3.3.2. Kết quả tách dòng và xác định trình tự gen cystatin

Sản phẩm PCR gen cystatin được làm sạch bằng bộ kit của Fermentas, sau đó được gắn vào vector pBT để tạo vector tái tổ hợp. Vector tái tổ hợp được biến nạp vào tế bào *E. coli* DH5 α bằng phương pháp sốc nhiệt. Nuôi khuẩn *E.coli* biến nạp trên môi trường LB có bổ sung thạch agar, ampicilin, X-gal và IPTG 100mM như mô tả ở mục 2.3.3.3.

Sau 16 giờ nuôi ổn định ở 37⁰C, trên đĩa thạch xuất hiện các khuẩn lạc màu xanh và trắng.

Chọn các khuẩn lạc màu trắng, hình tròn đều trên đĩa thạch thực hiện đồng thời phản ứng colony- PCR với chính cặp mồi nhân gen và nuôi khuẩn trong 3 ml môi trường LB lỏng có ampicilin. Kết quả kiểm tra (hình 3.13) chứng tỏ việc ghép nối sản phẩm PCR vào vector tách dòng, chọn dòng và phản ứng clony-PCR hy vọng đạt được kết quả như mong muốn.

Tinh sạch plasmid bằng bộ kit plasmid miniprep của Fermentas, sau đó xác định trình tự nucleotide của gen cystatin trên máy tự động ABI PRISM® 3100 Avant Genetic Analyzer của hãng Applied Biosystem tại Viện Công nghệ Sinh học.



Hình 3.13. Hình ảnh điện di sản phẩm colony-PCR

Kết quả xác định trình tự nucleotide của các mẫu nghiên cứu được xử lý bằng phần mềm DNASTAR cho thấy, gen cystatin của giống lạc L18, L23, dòng R46 và RM48 đều có kích thước 461 nucleotide. So sánh các trình tự này với trình tự nucleotide phân lập từ cDNA của 2 gen cystatin ở cây lạc trên ngân hàng gen quốc tế có mã số AY722693 là trình tự dùng để thiết kế mồi và trình tự mang mã số EU723567, chúng tôi nhận thấy gen mã hoá protein cystatin mà chúng tôi phân lập gồm 2 exon và 1 intron. Đoạn exon thứ nhất của gen gồm 102 nucleotide bắt đầu từ vị trí 1 đến 102 và đoạn exon thứ hai có 195 nucleotide, từ vị trí 267 đến 461; vùng intron ở giữa có 164 nucleotide, từ vị trí 103 đến 266 (hình 3.14).

	10	20	30
	-----+-----+-----+		
L18	A T G G C A G C A G T G G G T G C A C C T C G C G A A G T A		
R46	A T G G C A G C A G T G G G T G C A C C T C G C G A A G T A		
RM48	A T G G C A G C A G T G G G T G C A C C T C G C G A A G T A		
L23	A T G G C A G C A G T G G G T G C A C C T C G C G A A G T A		
EU723567	A T G G C A G C A G T G G G T G C A C C T C G C G A A G T A		
AY722693	A T G G C A G C A G T G G G T G C A C C T C G C G A A G T A		

		40		50		60																								
		+-----+-----+-----+																												
L18	G	C	C	G	A	A	A	C	G	A	G	A	A	C	A	G	C	C	T	C	G	A	G	A	T	C	G	A	T	
R46	G	C	C	G	G	A	A	A	C	G	A	G	A	A	C	A	G	C	C	T	C	G	A	G	A	T	C	G	A	T
RM48	G	C	C	G	G	A	A	A	C	G	A	G	A	A	C	A	G	C	C	T	C	G	A	G	A	T	C	G	A	T
L23	G	C	I	G	G	A	A	A	C	G	A	G	A	A	C	A	G	C	C	T	C	G	A	G	A	T	C	G	A	T
EU723567	G	C	C	G	G	A	A	A	C	G	A	G	A	A	C	A	G	C	C	T	C	G	A	G	A	T	C	G	A	T
AY722693	G	C	C	G	G	A	A	A	C	G	A	G	A	A	C	A	G	C	C	T	C	G	A	G	A	T	C	G	A	T

		70		80		90																								
		+-----+-----+-----+																												
L18	A	G	T	C	T	T	G	C	T	C	G	C	T	T	T	G	C	T	G	T	C	G	A	T	G	A	A	C	A	C
R46	A	G	T	C	T	T	G	C	T	C	G	C	T	T	T	G	C	T	G	T	C	G	A	T	G	A	A	C	A	C
RM48	A	G	T	C	T	T	G	C	T	C	G	C	T	T	T	G	C	T	G	T	I	G	A	T	G	A	C	A	C	A
L23	A	G	T	C	T	T	G	C	T	C	G	C	T	T	T	G	C	T	G	T	I	G	A	T	G	A	A	C	A	C
EU723567	A	G	T	C	T	T	G	C	T	C	G	C	T	T	T	G	C	T	G	T	C	G	A	T	G	A	A	C	A	C
AY722693	A	G	T	C	T	T	G	C	T	C	G	C	T	T	T	G	C	T	G	T	C	G	A	T	G	A	A	C	A	C

		100		110		120																								
		+-----+-----+-----+																												
L18	A	A	C	A	A	G	A	A	A	C	A	G	G	T	T	T	C	T	T	T	C	T	C	T	C	T	C	T	A	C
R46	A	A	C	A	A	G	A	A	A	C	A	G	G	T	T	T	C	T	T	T	C	T	C	T	C	T	C	T	A	C
RM48	A	C	A	A	G	A	A	A	C	A	G	G	T	T	T	C	T	T	T	C	T	C	T	C	T	C	T	A	G	
L23	A	A	C	A	A	G	A	A	A	C	A	G	G	T	T	C	T	T	T	C	T	C	T	C	T	C	T	I	G	
EU723567	A	A	C	A	A	G	A	A	A	C	A	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
AY722693	A	A	C	A	A	G	A	A	A	C	A	G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

		130		140		150																								
		+-----+-----+-----+																												
L18	C	G	A	T	C	A	T	C	G	C	T	T	T	G	G	C	T	C	T	G	G	T	T	T	T	G	G	T	T	C
R46	C	G	A	T	C	A	T	C	G	C	T	T	T	G	G	C	T	C	T	G	G	T	T	T	T	G	G	T	T	C
RM48	C	G	A	A	G	A	T	C	G	C	T	T	T	G	G	C	T	C	T	G	G	T	T	T	T	G	G	T	T	C
L23	C	G	A	A	G	A	T	C	G	C	T	T	T	C	G	C	T	I	T	G	G	T	T	T	T	G	G	T	T	C
EU723567	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
AY722693	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

		160		170		180																							
		+-----+-----+-----+																											
L18	G	T	T	T	G	T	A	T	G	A	T	T	G	A	T	C	A	T	G	A	T	T	A	G	T	G	T	T	C
R46	G	T	T	T	G	T	A	T	G	A	T	T	G	A	T	C	A	T	G	A	T	T	A	G	T	G	T	T	C
RM48	G	T	T	T	G	T	A	T	G	A	T	T	G	A	T	C	A	T	G	A	T	T	A	G	T	G	T	T	C
L23	G	T	T	T	G	T	G	T	G	A	T	T	G	A	T	C	A	T	G	A	T	T	A	G	T	G	T	T	C
EU723567	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
AY722693	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

		190		200		210																						
		+-----+-----+-----+																										
L18	G	A	T	T	T	G	A	T	T	T	A	A	T	T	T	A	A	A	A	T	A	A	T	T	T	G	G	G
R46	G	A	T	T	T	G	A	T	T	T	A	A	T	T	T	A	A	A	A	T	A	A	T	T	T	G	G	G
RM48	G	A	T	T	T	G	A	T	T	T	A	A	T	T	T	A	A	A	A	T	A	A	T	T	T	G	G	G
L23	G	A	T	T	T	G	A	T	T	T	A	A	T	T	T	A	A	A	A	T	A	A	T	T	T	G	G	G
EU723567	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
AY722693	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

		220		230		240																						
		+-----+-----+-----+																										
L18	T	G	G	T	T	G	T	T	T	G	G	A	T	T	T	T	A	T	C	T	A	A	T	G	T	G	A	C
R46	T	G	G	T	T	G	T	T	T	G	G	A	T	T	T	T	A	T	C	T	A	A	T	G	T	G	A	C
RM48	T	I	G	T	T	G	T	C	T	G	G	A	T	T	T	T	A	T	C	T	A	A	T	G	T	A	A	C
L23	T	G	G	T	T	G	T	T	T	G	G	A	T	T	T	T	A	T	C	T	A	A	T	G	T	G	A	C
EU723567	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
AY722693	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

	-----+-----
L18	C C A A T G C T T A A
R46	C C A A T G C T T A A
RM48	C C A A T G C T T A A
L23	C C A A T G C T T A A
EU723567	C C A A T G C T T A A
AY722693	C C A A T G C T T A A

Hình 3.14. Kết quả so sánh trình tự nucleotide gen cystatin của cây lạc

3.3.3. Kết quả so sánh trình tự gen và protein cystatin

3.3.3.1. So sánh trình tự nucleotide của gen cystatin

Kết quả so sánh trình tự nucleotide của gen cystatin của 2 giống lạc L18, L23 với hai dòng lạc R46, RM48 được tạo ra bằng công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật có sự sai khác. Trong đó, trình tự nucleotide của giống L18 và dòng R46 có nguồn gốc từ mô sẹo chịu thời khô mất nước giống nhau hoàn toàn. Dòng RM48 có 19 vị trí nucleotide sai khác so với giống gốc (L18). Nucleotide của gen cystatin giống lạc L18 có 14 vị trí sai khác so với giống L23.

Gen cystatin của cây đậu xanh tương đối bảo thủ, không có sự sai khác về gen cystatin của giống chịu hạn tốt và giống chịu hạn kém [17]. Kết quả xác định sự sai khác nucleotide trên gen cystatin cây lạc (bảng 3.17) cho thấy sự sai khác về gen cystatin lạc xuất hiện ở cả vùng exon và vùng intron. Trong vùng exon 1, giống L18 có 2 vị trí sai khác với L23 và 12 vị trí sai khác với dòng RM48. Ở vùng exon 2, giống L18 có 4 vị trí sai khác với giống L23 và có 1 vị trí sai khác với dòng RM48. Ngoài ra, gen cystatin của giống L23 và RM48 còn có 11 vị trí sai khác nằm trong đoạn intron, sự sai khác cụ thể được trình bày ở bảng 3.17 và các vị trí đóng khung trên hình 3.14. Như vậy, cùng có nguồn gốc từ giống L18, hai dòng lạc chọn lọc có sự sai khác nhau về trình tự nucleotide của gen cystatin, đồng thời cũng biểu hiện sai khác giữa giống có khả năng chịu hạn kém (L18) với giống có khả năng chịu hạn tốt hơn (L23).

Bảng 3.17. Sự sai khác về trình tự nucleotide trên gen cystatin của giống và dòng lạc nghiên cứu

STT	Vị trí	L23	L18	R46	RM48	Vùng sai khác
1	33	T	C	C	C	EXON
2	81	T	C	C	T	EXON
3	87	A	A	A	C	EXON
4	88	C	C	C	A	EXON
5	89	A	A	A	C	EXON
6	90	C	C	C	A	EXON
7	92	A	A	A	C	EXON
8	93	C	C	C	A	EXON
9	95	A	A	A	G	EXON
10	96	G	G	G	A	EXON
11	99	A	A	A	C	EXON
12	100	C	C	C	A	EXON
13	101	A	A	A	G	EXON
14	119	T	A	A	A	INTRON
15	120	G	C	C	C	INTRON
16	124	A	T	T	A	INTRON
17	125	G	C	C	G	INTRON
18	134	C	G	G	G	INTRON
19	138	T	C	C	C	INTRON
20	158	G	A	A	A	INTRON
21	212	G	G	G	T	INTRON
22	218	T	T	T	C	INTRON
23	238	G	G	G	A	INTRON
24	260	C	G	G	C	INTRON
25	271	C	G	G	C	EXON
26	278	T	C	C	C	EXON
27	326	C	T	T	T	EXON
28	389	T	G	G	G	EXON

Kết quả nghiên cứu chứng tỏ, hiệu quả việc xử lý tia gamma kết hợp với thời khô đã làm tăng tần số đột biến về gen cystatin so với mô sẹo chỉ chịu thời khô.

3.3.2.2. So sánh trình tự nucleotide ở vùng mã hóa

Vì gen cystatin phân lập từ DNA hệ gen của cây lạc có chứa vùng intron không tồn tại trong quá trình dịch mã, nên chúng tôi tiến hành loại bỏ intron và ghép nối các đoạn exon, kết quả thu được đoạn mã hóa cystatin dài 297 nucleotide. Đoạn mã hoá cystatin của cây lạc được so sánh với 6 trình tự đoạn mã hóa protein của gen cystatin thực vật có kích thước tương ứng công bố trên ngân hàng gen quốc tế (phụ lục 1). Kết quả đánh giá thông qua phân tích độ sai khác, độ tương đồng và xác định mối quan hệ về gen cystatin thực vật trình bày ở bảng 3.18 và hình 3.15.

Bảng 3.18. Độ tương đồng và độ sai khác đoạn mã hoá một số trình tự gen cystatin

Độ tương đồng (Percent Identity)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
1	■	100.0	99.3	98.0	100.0	66.3	45.9	58.8	80.1	58.5	1
2	0.0	■	99.3	98.0	100.0	66.3	45.9	58.8	80.1	58.5	2
3	0.7	0.7	■	98.6	99.3	66.6	46.0	59.0	80.8	58.7	3
4	2.1	2.1	1.4	■	98.0	66.0	45.9	58.5	81.3	58.5	4
5	0.0	0.0	0.7	2.1	■	66.3	45.9	58.8	80.1	58.5	5
6	46.2	46.2	45.8	47.1	46.2	■	53.6	69.9	64.8	71.8	6
7	97.8	97.8	96.7	97.8	97.8	72.4	■	50.5	49.8	49.1	7
8	63.3	63.3	62.9	64.3	63.3	38.8	81.2	■	60.9	79.8	8
9	23.1	23.1	22.2	21.6	23.1	49.0	83.7	56.3	■	59.8	9
10	63.1	63.1	62.7	63.1	63.1	35.6	85.4	23.5	58.5	■	10
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	

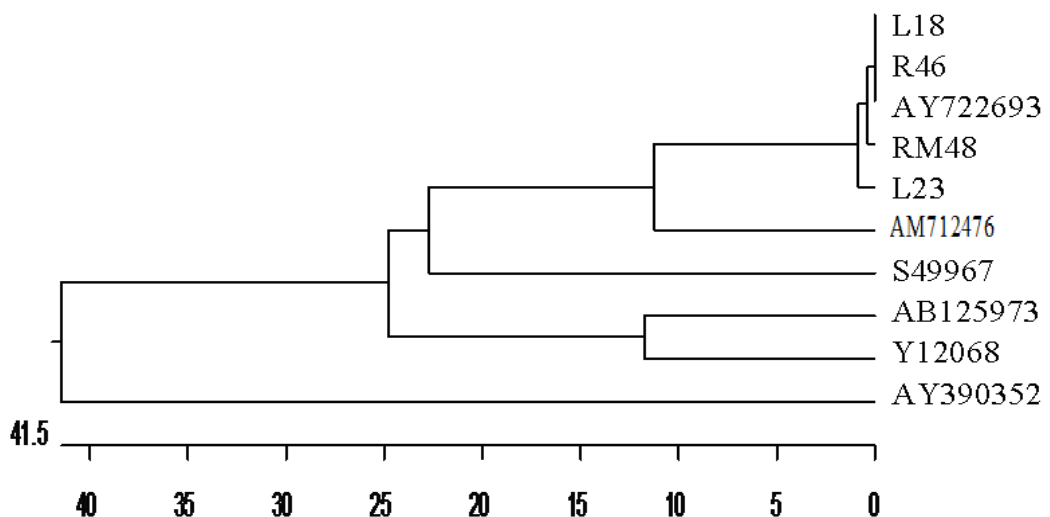
Độ sai khác(Divergence)

Trong đó:

1. Giống lạc L18 (*Arachis hypogaea* L.)
2. Dòng chọn lọc R46
3. Dòng chọn lọc RM48

4. Giống lạc L23 (*Arachis hypogaea* L.)
5. Lạc (*Arachis hypogaea*- mã số gen trên NCBI: AY722693) [134];
6. Lúa (*Oryza. Sativar* -mã số gen trên NCBI: S49967) [135];
7. Kiwi (*Actinidia deliciosa* -mã số gen trên NCBI: AY390352) [136];
8. Lúa (*Oryza sativar japonica* -mã số gen trên NCBI: AB125973) [137];
9. Đậu xanh (*Vigna radiata* -mã số gen trên NCBI: AM712476) [138];
10. Đại mạch (*Hordeum ulgare subsp*-mã số gen trên NCBI: Y12068) [139].

Kết quả nghiên cứu trên bảng 3.16 cho thấy 4 trình tự đoạn mã hóa gen cystatin lạc có mức tương đồng với 6 trình tự cystatin của các cây trồng khác công bố trên ngân hàng gen quốc tế từ 45,9% đến 100%. Các trình tự nucleotide của lạc có độ tương đồng từ 98,0% đến 100%. Đặc biệt, không có bất kỳ sự sai khác nào về nucleotide của giống lạc L18 với dòng chọn lọc R46 và trình tự nucleotide của giống *Arachis hypogaea* L. trên ngân hàng gen quốc tế (mã số AY722693) [134]. Đoạn mã hóa của gen cystatin lạc có độ tương đồng gần nhất với cystatin đậu xanh (81,3%) và xa nhất với cystatin quả kiwi (45,9%).



Hình 3.15. Mối quan hệ di truyền của một số đoạn mã hoá gen cystatin thực vật

Sơ đồ ở hình 3.15 thể hiện mối quan hệ di truyền của đoạn mã hóa gen cystatin của lạc với 6 cây trồng khác. So sánh trình tự đoạn mã hoá gen cystatin bằng phần mềm MegAlign, kết quả trên sơ đồ cho thấy 10 trình tự được phân thành 2 nhóm chính:

Nhóm I phân thành 3 nhóm phụ lớn và nhiều nhóm phụ nhỏ:

Nhóm phụ lớn 1 có nhóm phụ nhỏ 1 gồm đoạn mã hóa cystatin của các dòng và giống lạc có quan hệ gần gũi với nhau tỷ lệ phân tán chỉ trong khoảng 0,0 đến 2,1. Nhóm lạc này có quan hệ gần nhất với cystatin đậu xanh (giống MN93 nguồn đậu nhập nội từ Thái Lan, mã số AM712476) [138].

Nhóm phụ nhỏ 2 là sự phân bố của cystatin lúa (mã số S49967) [135].

Nhóm phụ lớn 3 gồm đại mạch (mã số Y12068) [139] và lúa (mã số AB125973) [137].

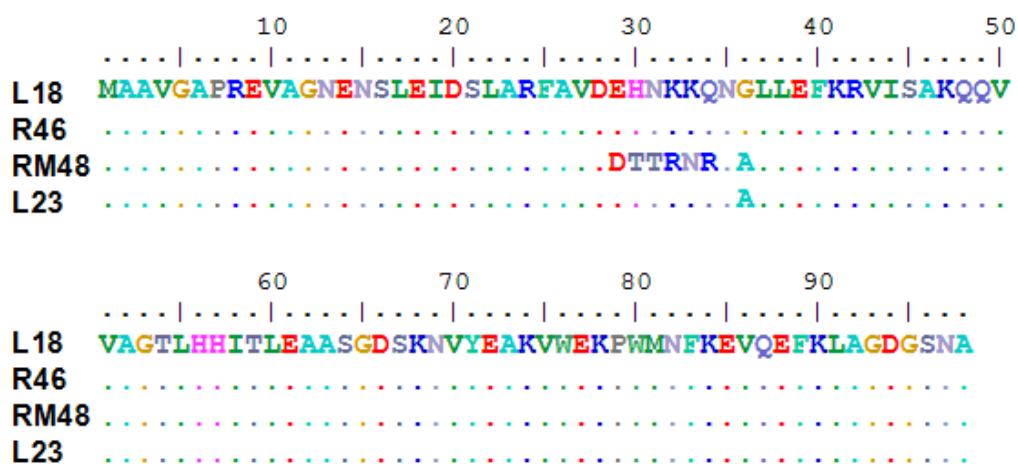
Nhóm II có khoảng cách xa nhất với các nhóm còn lại và chỉ có một trình tự đoạn mã hoá gen cystatin phân lập từ cây kiwi (mã số AY390352) [136], có tỷ lệ sai khác với cystatin cây lạc là 41,5%.

Sự thay đổi trình tự nucleotide có thể có hoặc không làm thay đổi trình tự các amino acid của protein. Kết quả nghiên cứu cystatin trên đậu xanh của Chu Hoàng Mậu và đtg (2008) không nhận được sự sai khác nào trên chuỗi polypeptid [17]. Đặc biệt với phân tử cystatin, khả năng hoạt động của chúng phụ thuộc rất lớn vào các đoạn bảo thủ. Vùng bảo thủ của đa số cystatin là glycine (G) gần đầu NH₂, vùng trung tâm chứa 5 amino acid là glutamin-amino acid bất kỳ-valine- amino acid bất kỳ-glycine (QxVxG) và đầu COOH chứa tryptophan (W)... Cystatin của cây lạc như thế nào là lý do để chúng tôi tiếp tục nghiên cứu về trình tự amino acid trên chuỗi polypeptide.

3.3.2.3. So sánh trình tự amino acid của protein cystatin

Trình tự nucleotide đoạn mã hoá gen cystatin của giống lạc L23, L18 và 2 dòng lạc nghiên cứu được suy diễn bằng phần mềm DNASTar tạo phân tử protein gồm 98 amino acid, với mã mở đầu AUG quy định tổng hợp methionine (M) và mã kết thúc là UAA. Kết quả so sánh 4 trình tự nghiên cứu bằng phần mềm chuyên dụng BioEdit biểu diễn ở hình 3.16.

So sánh trình tự amino acid của các dòng lạc nghiên cứu, chúng tôi dễ dàng phát hiện cả 4 trình tự amino acid nghiên cứu đều chứa 2 vùng bảo thủ của nhóm là LARFAV và QVVAG. Vị trí cụ thể của hai đoạn bảo thủ này là: L²²A²³R²⁴F²⁵A²⁶V²⁷ và Q⁴⁹V⁵⁰V⁵¹A⁵²G⁵³. Đối chiếu với cách phân loại gen cystatin của Margis và đtg (2008), Martinez và đtg (2008), chúng tôi phát hiện gen cystatin của các dòng và giống lạc nghiên cứu thuộc nhóm phân loại I của phytocystatin [89], [92].



Hình 3.16. So sánh trình tự amino acid của 4 mẫu nghiên cứu

Kết hợp với kết quả phân tích trên gen, nghiên cứu của chúng tôi chỉ ra rằng: vị trí của glutamine 34 (Q³⁴) và asparagine 35 (N³⁵) là cặp amino acid được mã hoá bởi những bộ ba phía đầu đoạn nối 2 exon của cystatin. Vị trí tương ứng với nó là vị trí arginine 34 (R³⁴) và asparagine 35 (N³⁵) của cystatin dòng RM48.

Hai amino acid ở vị trí 34 khác nhau là glutamine và arginine, là 2 amino acid khác nhau về đặc điểm cấu tạo gốc R, trong đó glutamine là amit của glutamic acid; khác với arginine là amino acid thuộc nhóm amino acid kiềm. Sự sai khác này có liên quan gì đến cấu trúc phân tử và hoạt động của cystatin trong ức chế hoạt động của cysteine proteinase, là gợi ý cho những nghiên cứu tiếp theo về cystatin lạc.

Bên cạnh sự sai khác amino acid ở vị trí 34, kết quả so sánh trình tự amino acid của giống lạc L23, L18 và 2 dòng R46, RM48 chúng tôi đã phát hiện thêm 6 vị trí sai khác trên chuỗi amino acid, nâng tổng số amino acid thay đổi trên cystatin lạc là 7 vị trí. Sự sai khác cụ thể thể hiện ở vị trí số 29, 30, 31, 32, 33, 34 và 36 của các dòng và giống nghiên cứu (hình 3.16).

Nếu lấy cystatin của giống L18 là căn cứ so sánh, chúng tôi nhận thấy, giống lạc L23 có một vị trí sai khác là vị trí amino acid 36, alanine thay thế glycine. Sự sai khác lớn nhất so với cystatin của giống lạc L18 là cystatin của dòng RM48 (7 vị trí sai khác). Phân tích các mối liên quan khác về trình tự amino acid của các dòng, giống phân tích với mức độ chịu hạn khác nhau cho thấy, giống L23 có khả năng chịu hạn tốt, sai khác với các trình tự của nhóm chịu hạn kém ở vị trí 36, cystatin dòng RM48 cũng có sự sai khác này. Ở các vị trí 29, 30, 31, 32, 33, 34 là những vị trí lân cận trong vùng CYS của dòng RM48 có sự khác biệt với các trình tự nghiên cứu, rất có thể sự khác biệt này góp phần làm tăng độ ái lực của chất ức chế với trung tâm hoạt động của enzyme, do đó đã làm tăng cường khả năng chống chịu hạn cũng như chống chịu với các yếu tố bất lợi khác của ngoại cảnh.

Bảng 3.19. Thành phần amino acid của protein cystatin ở cây lạc

Loại amino acid	RM48	L18	L23	Amino acid kỵ nước	Amino acid ưa nước	Amino acid không thay thế
A (Ala)	14	13	14	*		
D (Asp)	5	4	4		+	
E (Glu)	9	10	10		+	
I (Ile)	3	3	3	*		-
M (Met)	2	2	2		+	-
R (Arg)	5	3	3		+	
C (Cys)	0	0	0		+	
G (Gly)	6	7	6	*		
L (Leu)	7	7	7	*		-
F (Phe)	4	4	4	*		-
N (Asn)	8	7	7		+	
Q (Gln)	3	4	4		+	
H (His)	2	3	3		+	
K (Lys)	7	9	9		+	-
P (Pro)	2	2	2		+	
S (Ser)	6	6	6		+	
V (Val)	9	9	9	*		-
T (Thr)	4	2	2		+	-
W (Trp)	2	2	2	*		-
Y (Tyr)	1	1	1		+	
(*) Amino acid kỵ nước	45	45	45	45,92% so với tổng amino acid		
(+) Amino acid ưa nước	53	53	53	54,08% so với tổng amino acid		
(-) Amino acid không thay thế	28	28	28	28,57% so với tổng amino acid		

Kết quả phân tích thành phần amino acid của cystatin giống lạc L23, L18 và 2 dòng chọn lọc R46, RM48 trên bảng 3.19 cho thấy có sự khác biệt khá lớn về amino acid của các dòng và giống lạc.

Tuy có sự khác biệt về một số loại amino acid trong thành phần protein cystatin cây lạc, nhưng kết quả thống kê tổng số các amino acid ưa nước, amino acid kỵ nước hay nhóm các amino acid thiết yếu cho người không nhận được sự khác biệt giữa các dòng và giống chọn lọc.

Lượng amino acid kỵ nước chiếm tỷ lệ tương đối lớn trong thành phần cystatin lạc (45,92%) cho phép dự đoán sự cư trú của cystatin liên quan đến tính chịu hạn của cây lạc. Rõ ràng những protein kỵ nước sẽ phân bố trên màng tế bào hoặc hệ màng, còn protein ưa nước tan trong dịch nguyên sinh. Do đó, với chức năng ức chế hoạt động cysteine proteinase rất có thể cystatin cây lạc tham gia bảo vệ màng tế bào sẽ có hiệu quả trong điều kiện thiếu nước cực đoan.

Phân tích gen cystatin ở lạc với cystatin của nhiều loại thực vật khác, chúng tôi xác định được vị trí của cystatin lạc thuộc nhóm I của họ phytocystatin. Ảnh hưởng của chiếu xạ kết hợp với thời khô đã làm thay đổi trình tự nucleotide trên gen và thay đổi amino acid trên protein cystatin của các dòng lạc chọn lọc so với giống gốc. Tuy nhiên, khả năng chịu hạn của thực vật là tính trạng đa gen và bản thân gen cystatin là gen liên quan đến nhiều khả năng chống chịu khác của thực vật. Kết quả nghiên cứu thu được sẽ là căn cứ để nghiên cứu sâu hơn về gen cystatin ở lạc.

KẾT LUẬN

1. Xử lý mô sẹo của 10 giống lạc bằng kỹ thuật thổi khô xác định được giống lạc L18 có khả năng chịu mất nước thấp nhất. Ở ngưỡng chọn lọc thổi khô 9 giờ kết hợp với chiếu xạ tia gamma 2krad đã làm giảm tỷ lệ tái sinh cây và làm xuất hiện các kiểu hình thấp cây ở lạc.
2. Đã tái sinh được 198 dòng lạc có nguồn gốc từ mô sẹo chịu mất nước và mô sẹo chịu chiếu xạ tia gamma kết hợp với thổi khô gây mất nước của giống lạc L18. Đã tuyển chọn được 3 dòng lạc có khả năng chịu hạn cao là RM48, R46 và RM47. Dòng RM48 có khoảng cách di truyền so với giống gốc là 12%, dòng RM47 và dòng R46 có khoảng cách di truyền với giống gốc L18 là 9,5%.
3. Hệ số đa dạng di truyền của các dòng lạc chọn lọc ở thế hệ thứ Năm là 11,09%. Có 5 chỉ thị RAPD đặc trưng được phát hiện ở 2 dòng lạc RM48 và RM47: RM48/OPA07-750bp; RM48/OPA08-500bp; RM48/OPB05-900bp; RM48/UPC348-200bp; RM47/OPH08-250bp.
4. Gen cystatin của cây lạc có 461 nucleotide, có 2 exon và 1 intron, thuộc nhóm I của phytocystatin. Đoạn mã hóa ở gen cystatin của các dòng, giống lạc nghiên cứu có sự tương đồng cao nhất với cystatin của đậu xanh (81,3%), thấp nhất với cystatin của cây kiwi (42,9%). Trình tự amino acid của cystatin ở dòng lạc RM48 có sự sai khác lớn nhất so với giống gốc L18 ở 7 amino acid. Sự thay thế amino acid của dòng RM48 bởi amino acid của giống gốc ở các vị trí 29 (Glu → Asp), 30 (His → Thr), 31 (Asn → Thr), 32 (Lys → Arg), 33 (Lys → Asn), 34 (Glu → Arg), 36 (Gly → Ala). Những thay đổi amino acid là gợi ý để tiếp tục tìm kiếm mối liên quan của cystatin với khả năng chống chịu hạn.

ĐỀ NGHỊ

1. Tiếp tục theo dõi, phân tích và bồi dưỡng 3 dòng lạc ưu việt là R46, RM47, RM48 để giới thiệu khảo nghiệm giống.
2. Thiết kế vector mang gen cystatin và chuyển vào cây lạc cũng như các loại cây trồng khác để nghiên cứu vai trò của cystatin đến khả năng chịu hạn và một số đặc tính khác ở thực vật.

CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. **Vũ Thị Thu Thủy**, Nguyễn Thị Tâm, Chu Hoàng Mậu (2009), Chọn dòng tế bào chịu hạn ở lạc (*Arachis hypogaea* L) bằng phương pháp nuôi cấy *in vitro*, *Tạp chí Nông nghiệp và phát triển nông thôn*, 7: 14-19.
2. **Vũ Thị Thu Thủy**, Nguyễn Vũ Thanh Thanh, Chu Hoàng Mậu, Nguyễn Thị Tâm (2009), Phân tích trình tự gen cystatin của giống lạc L18 (*Arachis hypogaea* L.), *Báo cáo Hội nghị Sinh học toàn quốc*: 397-400.
3. **Vũ Thị Thu Thủy**, Đinh Tiến Dũng, Nguyễn Thị Tâm, Chu Hoàng Mậu (2010), Kết quả chọn lọc một số dòng lạc có nguồn gốc từ mô sẹo chịu mất nước của giống lạc L18, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Đại học Thái Nguyên*, 72(10):122-126.
4. **Vũ Thị Thu Thủy**, Nguyễn Thị Tâm, Chu Hoàng Mậu, Nguyễn Vũ Thanh Thanh (2011), Nghiên cứu đặc điểm 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): 86-95.
5. **Vũ Thị Thu Thủy**, Nguyễn Thị Tâm, Chu Hoàng Mậu, Nguyễn Vũ Thanh Thanh (2011), Chọn lọc dòng biến dị chịu mất nước và chiếu xạ ở cây lạc (*Arachis hypogaea* L), *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 9(3): 349-356.
6. **Công bố 04 trình tự gen cystatin trên ngân hàng gen quốc tế**
 - (1) **Vu,T.T.T.**, Nguyen,T.V.T., Chu,M.H. and Nguyen,T.T. (2010), *Arachis hypogaea* cystatin gene 1, exons 1-2, EMBL, GenBank, Accession FN811133.
 - (2) **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, EMBL, GenBank, Accession FR691053.
 - (3) **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, EMBL, GenBank, Accession FR745399.
 - (4) **Vu,T.T.T.**, Chu,M.H., Nguyen,T.T.V. and Nguyen,T.T.(2011), *Arachis hypogaea* cys gene for cystatin, cultivar L18, isolated from R46 line, EMBL, GenBank, Accession HE578279.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Tiếng Việt

1. Lê Trần Bình, Lê Thị Muội (1998), "*Phân lập gen và chọn dòng chống chịu ngoại cảnh bất lợi ở cây lúa*", Nxb Đại học Quốc Gia Hà Nội, 5-200.
2. Phạm Thị Trân Châu, Nguyễn Thị Hiền, Phùng Gia Tường (1997), "*Thực hành hóa sinh học*", Nxb Giáo dục: 27-28, 54-55.
3. Nguyễn Thị Chinh (2005), "*Kỹ thuật thâm canh lạc năng suất cao*", Nxb Nông nghiệp, 25-47.
4. Ngô Thế Dân, Nguyễn Xuân Hồng, Đỗ Thị Dung, Nguyễn Thị Chinh, Vũ Thị Đào, Phạm Văn Toàn, Trần Đình Long, Gowda (2000), "*Kỹ thuật đạt năng suất cao ở Việt Nam*", Nxb Nông nghiệp, 1-233.
5. Nguyễn Lâm Dũng (1979), "*Một số phương pháp nghiên cứu vi sinh vật học*", Nxb Giáo dục, 3: 116-120.
6. Lê Xuân Đắc, Lê Trần Bình, Lê Thị Muội, Lê Duy Thành (2006), "*Đánh giá một số đặc điểm nông sinh học và sinh hoá các dòng lúa tái sinh từ mô sẹo được xử lý tia gamma của một số giống lúa địa phương*", *Hội nghị Khoa học và Công nghệ hạt nhân toàn quốc, lần thứ 4*: 218-223.
7. Phan Quốc Gia, Nguyễn Thiên Lương, Nguyễn Thị Chinh, Nguyễn Văn Thắng, Nguyễn Xuân Thu, và cs (2008), "*Kết quả nghiên cứu đánh giá khả năng chịu hạn của một số giống lạc tại Thanh Trì, Hà Nội*", *Tạp chí Nông Nghiệp và Phát triển nông thôn*, 4: 37-40.
8. Vũ Công Hậu, Ngô Thế Dân, Trần Thị Dung (1995), "*Cây lạc*", Nxb Nông nghiệp, 11-368.
9. Nguyễn Đức Hoàng, Nguyễn Thị Tâm, Chu Hoàng Mậu (2008), "*Sự sai khác hệ gen của một số dòng lúa thể hệ R3 có nguồn gốc từ mô sẹo chịu mất nước*", *Tạp chí Di truyền học và ứng dụng*, 1(4): 33-37.
10. Nguyễn Thị Thúy Hương, Chu Hoàng Mậu, Lê Văn Sơn, Nguyễn Hữu

- Cường, Lê Trần Bình, Chu Hoàng Hà (2008), “Đánh giá khả năng chịu hạn và phân lập gen P5CS của một số giống đậu tương (*Glycine max* L.Merrili)”. *Tạp chí Công nghệ sinh học* 6(4): 459-466.
11. Nguyễn Tấn Lê, Vũ Đình Ngân (2010), “Nghiên cứu đời sống cây lạc trong điều kiện nóng hạn ở vụ hè tại Đà Nẵng”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Đại học Đà Nẵng*, 5 (40): 117-124.
12. Trần Thị Phương Liên, Nông Văn Hải (2008), “Dehydrin- protein chống mất nước ở thực vật”, *Tạp chí Công nghệ sinh học*, 6 (2): 133-143.
13. Nguyễn Hoàng Lộc (1992), “Chọn dòng chịu muối và chịu mất nước ở thuốc lá bằng kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật”, Luận án phó tiến sĩ sinh học, Hà Nội.
14. Nguyễn Thiên Lương, Phan Quốc Gia, Nguyễn Thị Chinh, Nguyễn Văn Thắng, Nguyễn Xuân Thu, Phạm Thị Thủy, Vũ Thị Ngọc Phượng (2009), “Kết quả đánh giá khả năng chịu hạn của một số giống lạc 2008”, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn* 7: 67-72.
15. Chu Hoàng Mậu, Nguyễn Thị Tú Lan, Nguyễn Thị Tâm (2010), “Kết quả chọn lọc các dòng mô sẹo chịu mất nước ở cây đậu tương (*Glycine max* L. Merrill)”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Đại học Thái Nguyên*, 67 (5): 113-117.
16. Chu Hoàng Mậu (2008), *Phương pháp phân tích di truyền hiện đại trong chọn giống cây trồng*, Nxb Đại học Thái Nguyên, 13-202.
17. Chu Hoàng Mậu, Nguyễn Vũ Thanh Thanh, Nguyễn Thị Thu Trang (2008), “So sánh trình tự gen cystatin ở cây đậu xanh (*Vigna radiata* (L.) Wilczek)”. *Tạp chí Sinh học*, 30(3): 121-128.
18. Nguyễn Văn Mùi (2001), “*Thực hành Hóa sinh học*”, Nxb Đại học Quốc gia Hà Nội, 66-91.
19. Trương Thị Bích Phượng, Nguyễn Văn Song, Nguyễn Hoàng Lộc (2005), “Phân tích thành phần protein hạt và trình tự gen chịu hạn ở các dòng lúa

- chọn lọc *in vitro*", *Báo cáo Hội nghị Sinh học phân tử, tế bào và các định hướng ứng dụng*, 1358-1361.
20. Hoàng Tấn Quang, Nguyễn Đức Huy, Trương Thị Bích Phượng, Nguyễn Hoàng Lộc (2008), "Phân tích điện di hai chiều protein của các dòng lúa (*Oryza sativa* L.) chịu hạn chọn lọc từ nuôi cấy *in vitro*", *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 6 (4): 439-443.
 21. Trần Duy Quý (1997), *Các phương pháp mới trong chọn tạo giống cây trồng*, Nxb Nông nghiệp, 237-258.
 22. Nguyễn Xuân Tài, Đỗ Tiến Phát, Đinh Thị Phòng, Phan Thị Liên Hương, Vũ Văn Vụ (2005), "Nghiên cứu biến dị soma trên quần thể cây lạc (*Arachis hypogaea* L.) tái sinh *in vitro*". *Những vấn đề Nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống*, Nxb KH và KT, 1366-1369.
 23. Nguyễn Thị Tâm, Võ Văn Ngọc (2009), "Đặc điểm hoá sinh của một số dòng lúa chọn lọc thế hệ R₄ có nguồn gốc từ mô sẹo chịu mất nước", *Báo cáo hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc*, Nxb KH và KT, 340-343.
 24. Nguyễn Thị Tâm, Nguyễn Thu Giang (2008), "Đánh giá sự đa hình ADN của một số dòng lạc có nguồn gốc từ mô sẹo chịu mất nước", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Đại học Thái Nguyên*, 4 (48): 58-64.
 25. Nguyễn Thị Tâm, Nguyễn Thị Thu Nga (2007), "Đánh giá khả năng chịu hạn ở mức độ mô sẹo và giai đoạn cây non của các giống lạc L12, L14, L15 và V79)", *Báo cáo hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc*, Nxb KH và KT, 805-808.
 26. Nguyễn Thị Tâm, Chu Hoàng Mậu, Ngô Thị Liêm, Bùi Thị Hoài Loan (2006), "Nghiên cứu môi trường nuôi cấy *in vitro* phôi lạc phục vụ nghiên cứu chọn dòng chịu hạn", *Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Đại học Thái Nguyên*, 1(37): 87-92.
 27. Nguyễn Thị Tâm, Lê Trần Bình (2003), "Ảnh hưởng của nhiệt độ cao đến hoạt độ α amylase và hàm lượng đường tan ở hạt nảy mầm của một số giống

và dòng lúa chọn lọc từ mô sẹo chịu nhiệt độ cao", *Tạp chí Công nghệ sinh học* 1 (1): 101-108.

28. Nguyễn Thị Tâm, Đinh Thị Phòng, Lê Trần Bình (1999), "Ứng dụng công nghệ tế bào thực vật vào việc chọn dòng chịu nóng ở lúa", *Báo cáo hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc*, 819-826.
29. Lê Xuân Thám, Hồ Quang Cua, Nguyễn Thị Thu Hiền, Nguyễn Thị Thu Huyền, Nguyễn Ngọc Ngân, Nguyễn Thị Ngọc Tú, Lê Trần Bình, Lê Xuân Đắc (2003), "Các dòng đột biến phóng xạ thuần giống lúa tám thơm (*Oryza sativa* sp)", *Kỷ yếu hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc*, 962-966.
30. Nguyễn Đức Thành, Lê Thị Bích Thủy, Đặng Minh Lụa (2009), "Các dòng đột biến chịu hạn từ hạt giống lúa cận xử lý phóng xạ bằng tia gamma", *Báo cáo khoa học tại hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc*, 369-372.
31. Nguyễn Đức Thành (2000), *Nuôi cấy mô tế bào thực vật - nghiên cứu và ứng dụng*, Nxb Nông nghiệp, 9-110.
32. Nguyễn Vũ Thanh Thanh, Phạm Thị Vân, Phan Trọng Hoàng, Chu Hoàng Mậu, Lê Trần Bình (2006), "Tách dòng và xác định trình tự gen LEA ở 4 giống đậu xanh KP11, MN93, 263 và KPS1", *Tạp chí Công nghệ sinh học* 4 (3): 343-352.
33. Nguyễn Đình Thi (2009), Nghiên cứu sử dụng phối hợp các nguyên tố vi lượng (B, Mo, Zn) và chất điều hòa sinh trưởng (α - NAA) tác dụng tăng sinh trưởng và năng suất lạc (*Arachis hypogaea* L.) trên đất cát ở Thừa Thiên Huế". *Tạp chí Khoa học, Đại học Huế*, 52: 127-134.
34. Lê Thị Bích Thủy, Đặng Thị Minh Lụa, Nguyễn Thị Kim Liên, Nguyễn Đức Thành (2008), "Đánh giá khả năng chịu hạn của các dòng lúa đột biến từ hai giống lúa Chí Chừa 1 và Chí Chừa 2 bằng xử lý hạn nhân tạo và phân tích phân tử", *Hội nghị Hoá Sinh và Sinh học phân tử phục vụ nông sinh y học và công nghiệp thực phẩm*, 241-244.
35. Lê Thị Bích Thủy, Đặng Thị Minh Lụa, Tạ Ngọc Ly, Nguyễn Thị Kim Liên, Nguyễn Đức Thành (2007a), "Ảnh hưởng của tia gamma lên khả năng tái

sinh cây từ mô sẹo lúa chiếu xạ và phân tích phân tử các dòng cây tái sinh", *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 5 (2): 225-231.

36. Lê Thị Bích Thủy, Tạ Thị Kim Nhung, Đặng Thị Minh Lua, Nguyễn Đức Thành (2007b), "Sử dụng bức xạ gamma để tạo dòng lúa C71 đột biến chịu hạn", *Tuyển tập báo cáo hội nghị KH&CN hạt nhân toàn quốc, lần thứ VII*: 425-430.
37. Nguyễn Tường Vân, Lê Trần Bình, Lê Thị Muội (1994), "Chọn dòng chịu muối ở lúa bằng công nghệ tế bào thực vật", *Kỷ yếu Viện Công nghệ sinh học*, 19-27.
38. Nguyễn Thị Vinh, Lê Duy Thành, Lê Trần Bình, Lê Thị Muội (1995), "Gây tạo các dòng lúa chống chịu phèn bằng kỹ thuật chọn lọc biến dị dòng soma", *Tạp chí Di truyền học và ứng dụng*, 4: 21-27.

Tiếng Anh

39. Abdelsamad A., EL- Sayed O. E., Ibrahim H.F. (2007), "Development of drought tolerance double haploid wheat using biochemical genetic marker on *in vitro* culture", *J. Appl. Sci. Res.*, 3 (11): 1589-1599.
40. Abe K., Emori Y., Kondo H., Susuki K., Aria S. (1987), "Molecular cloning of a cysteine proteinase inhibitor of rice (*oryzacystatin*)-Homology with animal cystatins and transient expression in the ripening process of rice seeds", *J. Biol. Chem.* 262 (35): 16793-16797.
41. Abraham Z., Martinez M., Carbonero P., Diaz I. (2006), "Structural and functional diversity within the cystatin gene family of *Hordeum vulgare*", *J Exp Bot.* 57: 4245-4255.
42. Akcay U. C., Ercan O., Kavas M., Yildiz L., Yilmaz C., Oktem H. A., Yucel M. (2010), "Drought-induced oxidative damage and antioxidant responses in peanut (*Arachis hypogaea* L.) seedlings", *Plant Growth Regul.* 61(1): 21-28.
43. Arunyanark A., Jogloy1 S., Vorasoot N., Akkasaeng C., Kesmala T., Patanothai A., (2009), "Stability of relationship between chlorophyll density and soil plant

- analysis development chlorophyll meter readings in peanut across different drought stress condition", *Asian Journal of plant sciences*, 1-9.
44. Arunyanark A., Jogloy¹ S., Akkasaeng C., Vorasoot N., Kesmala T., Nageswara Rao R. C., Wright G. C., Patanothai A. (2008), "Chlorophyll stability is an indicator of drought tolerance in peanut", *Journal of Agronomy and Crop Science*, 194(2): 113–125.
 45. Barrett A.J. (1986), "The cystatins: a diverse superfamily of cysteine peptidase inhibitors", *Biomed. Biochim. Acta* 45: 1363–1374.
 46. Benchabane M., Schluter U., Vorster J., Goulet M. C., Michaud D. (2010), "Plant cystatins", *Biochimie*: 1657-1666.
 47. Beck E. H., Fettig S., Knake C., Hartig K., Bhattarai T. (2007), "Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress", *Journal. Biosci* 32 (3): 10-501.
 48. Boontang S., Girdthai T., Jogloy S., Akkasaeng C., Vorasoot N., Patanothai A., Tantisuwichwong N. (2010), "Responses of released cultivars of peanut to terminal drought for traits related to drought tolerance", *Asian Journal of plant sciences* 9 (7): 423-431.
 49. Brant W. T., Laura R. L., Gwendolyn E. T., Adam R. F. (2007), "Drought tolerance versus drought avoidance: a comparison of plant- water relations in herbaceous wetland plants subjected to water withdrawal and repletion", *Wetlands* 27(3): 656-667.
 50. Bray E. A. (1997), Plants responses to water deficit. *Trends in Plant Science* 2(2):47-54.
 51. Bray E. A. (1993), "Molecular responses to water deficit", *Plant Physiol* 103: 1035-1040.
 52. Christova P.K., Christov N. K., Imai R. (2006), "A cold inducible multidomain cystatin from winter wheat inhibits growth of the snow mold fungus, *Muicrodochium nivale*", *Planta* 223:1207-1218.

53. Corre M. F., Cejudo F. J., Mazubert C., Vidal J., Lelandais B. C., Torres G., Rode A., Hartmann C. (2002), "Characterization of the expression of a wheat cystatin gene during caryopsis development", *Plant Mol Biol*, 50: 98- 687.
54. Danylchenko O., Sorochinsky B. (2005), "Use of RAPD assay for the detection of mutation changes in plant DNA induced by UV-B and gamma-ray", <http://www.biomedcentral.com/1471-2229>.
55. Del Rio A. H., Bamberg J. B. (2006), "Use of RAPD and SSR markers to assess putative duplicate germplasm collection at cip and us potato", *American Journal of Potato Research* 83: 279-285.
56. Dinakar N., Nagajyothi P. C., Suresh S., Udaykiran Y., Damodharam T. (2008), "Phytotoxicity of cadmium on protein, proline and antioxidant enzyme activities in growing *Arachis hypogaea* L. Seedlings", *J Environ Sci (China)*, 20(2): 199-206.
57. Diop N.N., Kidric., Repellin A., Gareil M., d'Acry-Lameta A., Pham Thi A.T., Zuil-Fodil Y. (2004), "A multicystatin is induced by drought-stress in cowpea (*Vigna unguiculata* (L) Walp.) leaves", *FEBS Lett* 577(3): 50-545.
58. Dix P. J. (1980), "Environmental stress resistance: Selection in plant cell culture" In: *Plant Cell Culture: Results and perspectives*, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 183-186.
59. Dramé K. N., Clavel D., Repellin A., Passaquet C., Zuily-Fodil Y. (2007), "Water deficit induces variation in expression of stress-responsive genes in two peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars with different tolerance to drought", *Plant Physiol Biochem* 45 (3-4): 236-243.
60. Farooq M., Wahid A., Kobayashi N., Fujita D., Basra S. M. A. (2009), "Plant drought stress: effects, mechanisms and management", *Agron. Sustain. Dev.* 29(1): 185-212.
61. Fischer J., Becker C., Hillmer S., Horstmann C., Neubohn B., Schlerth A., Senyuk V., Shutov A., Muntz K. (2000), "The families of papain and legumain like cysteine proteinases from embryonic axes and cotyledons of

- Vicia* seed: developmental patterns, intercellular localization and functions in globulin proteolysis", *Plant Mol Biol*: 48: 83-101.
62. Fondevilla S., Rubiales D., Moreno M. T., Torres A. M. (2008), "Identification and validation of RAPD and SCAR markers linked to the Er3 conferring resistance to Erysiphe pisi DC in pea", *Mol Breeding* 22(3): 193-200.
63. Francks S. J. (2011), "Plasticity and evolution in drought avoidance and escape in the annual plant *Brassica rapa*", *New Phytol* doi: 10.1111/j.1469-8137.
64. Garcia-Olmedo F., Salcedo G., Sanchez-Monge R., Gomez L., Royo J., Carbonero P. (1987), "Plant proteinaceous inhibitors of proteinases and α -amylases", *Oxf. Surv. Plant Mol. Cell Biol* 4: 275–334.
65. Gawel N. J., Jarnet R. T. (1991), "Genomic DNA isolation." <http://www.weihenstephan.de/pbpz/bambara/htm/dna.htm>.
66. Girard C., Rivard D., Kiggundu A., Kunert K., Gleddie S. C., Cloutier C., Michaud D. (2007), "A multicomponent, elicitor-inducible cystatin complex in tomato, *Solanum lycopersicum*", *New Phytol* 173 (4): 841–851.
67. Goyal K., Walton L. J., Tunnacliffe A. (2005), "LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress", *Biochem Journal* 388 (1): 151-157.
68. Grudkowska M., Zagdańska B. (2004), "Multifunctional role of plant cysteine proteinases", *Acta biochimica Polonica* 51: 609-624.
69. Guerrini G. I., Trigueiro R. M., Leite R. M., Wilcken C. F., Velini E. D., Mori E. S., Furtado E. L., Marino C. L., Maia I. G. (2005), "Eucalyptus ESTs involved in the production of 9-cis epoxycarotenoid dioxygenase, a regulatory enzyme of abscisic acid production", *Genet Mol Biol*, 28 (3): 640-643.
70. Habib H, Fazili K. M. (2007), "Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants", *Biotechnol. Mol. Biol. Rev.*, 2(3): 68-85.
71. Hart F. U. (1996), "Molecular chaperones in cellular protein folding", *Nature* 381: 571–579

72. Hernan E. L., Karlovsky P. (2006), "Genetic relationship and diversity in a sesame (*Sesamun indicum* L) germplasm collection using amplified fragment length polymorphism (AFLP)", *BMC Genetics*: 7-17.
73. Hofmann N. E., Raja R., Nelson R. L., Korban S. S. (2004), "Mutagenesis of embryogenic cultures of soybean and detecting polymorphisms using RAPD markers", *Biol. Plant.*, 48(2): 173-177.
74. Hong, Y., Zheng S., Wang X. (2008) "Dual functions of phospholipase D α 1 in plant response to drought". *Mol. Plant* 1, 262–269.
75. Hwang J. E., Hong J. K., Je J. H., Lee K. O., Kim D. Y., Lee S. Y., Lim C. O. (2009), "Regulation of seed germination and seedling growth by an *Arabidopsis* phytocystatin isoform, AtCYS6", *Plant Cell Rep* 28 (11): 1623–1632.
76. ICRISAT (2005), "Progress report of IFAD", *ICRISAT*, 20-75.
77. Jacob T., Ritchie S., Assmann S.M., Gilroy S. (1999), "Abscisic acid signal transduction in guard cells is mediated by phospholipase D activity", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 12192-12197.
78. Kader J. C. (1996), "Lipid transfer proteins in plant", *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* 47: 627-654.
79. Kobayashi F., Macta E., Teráhima A., Kawaur K., Ogihara Y., Takumi S. (2008), "Development of abiotic stress tolerance via bZIP-type transcription factor LIP19 in common wheat". *J. Exp. Bot.* 59: 891–905.
80. Konzak C. F. (2001), "Breeding in crop plants- mutations and *in vitro* mutation breeding", *Crop Science* 41: 253-256.
81. Kosmas S. A., Arygyrokastritis A., Loukas M G., Eliopoulos E., Spyrostsakas A., Pantouses J., Kaltsikes H. (2006), "Isolation and characterization of drought related trehalose 6 phosphate synthase gene from cultivated cotton (*Gossypium hirsutum* L.)", *Planta*, 223: 329-339.

82. Kramer P. J. (1983), "Drought tolerance and water use efficiency", *Academic Press* 13: 390-415.
83. Kulkarni M., Deshpande U. (2007), "In vivo screening of tomato genotypes for drought resistance using polyethylene glycol", *African Journal of Biotechnology* 6 (6): 691-696.
84. Kuroda M., Kiyosaki T., Matsumoto I., Misaka T., Arai S., Abe K. (2001), "Molecular cloning, characterization and expression of wheat cystatins", *Biosci Biotechnol Biochem.* 65(1): 22-28.
85. Larkin P. J., Scowcroft W. R.. (1981), "Somaclonal variation- a source of variation from cell cultures for plant improvement", *Theor Appl Genet* 60: 197-214.
86. Liu W. (2010), "Clone of resveratrol synthesis gene from peanut", Accession: FM955403, FM955401, FM955402, FM955398.
87. Maliga P. (1984), "Cell culture procedure for mutant selection and characterization in *nicotiana plumbaginifolia*", *Somatic cell culture and their application* Vasil I. K, Acad Press Orlan, 552-556.
88. Maluszynski M., Kasha K. J. (2002), "Mutations, *in vitro* and molecular techniques for environmentally sustainable crop improvement", *Kluwer Academic Publishers Dordrecht*, 246.
89. Margis-Pinheiro M., Zolet A. C., Loss G., Pasquali G., Margis R.. (2008), "Molecular evolution and diversification of plant cysteine proteinase inhibitors: New insights after the poplar genome", *Mol Phylogenet Evol* 49: 55-349.
90. Margis R., Reis E. M., Vileret V. (1998), "Structural and phylogenetic relationships among plant and animal cystatins". *Arch Biochem Biophys*: 359: 24-30.
91. Martinez M., Cambra I., Carrillo L., Diaz-Mendoza M., Diaz I. (2009), "Characterization of the entire cystatin gene family in barley and their target

- cathepsin L-like cysteine-proteases, partners in the hordein mobilization during seed germination". *Plant Physiol.* (3): 1531-45.
92. Martinez M., Diaz I. (2008), "The origin and evolution of plant cystatins and their target cysteine proteinases indicate a complex functional relationship". *BMC Evol Biol*: 8: 198.
93. Massonneau A., Condamine P., Wisniewski J. P., Zivy M., Rogowsky P. M. (2005), "Maize cystatins respond to developmental cues, cold stress and drought", *Biochim Biophys Acta* 1729 (3): 99-186.
94. Matheka J. M., Magiri E., Rasha A. O., Machuka J. (2008), "*In vitro* selection and characterization of drought tolerant somaclones of tropical maize (*Zea mays* L)", *Biotechnology* 7(4): 641-650.
95. McKently A. H., Moore G. A., Gardner F. P. (2000), "Regeneration of peanut and perennial peanut from cultured leaf tissue", *Plant Biotechnology* DOI:10.2225/Vol3-issue2-fulltext-8.
96. Megdiche W., Passaquet C., Zourrig W., Zuily Fodil Y., Abdelly C. (2009) "Molecular cloning and characterization of novel cystatin gene in leaves *Cakile maritima* halophyte", *J Plant Physiol*, 166: 739-749.
97. Merops: the peptidase database. <http://merops.sanger.ac.uk>
98. Mitra J. (2001), "Genetics and genetic improvement of drought resistance in crop plants", *Current Science* 80: 758-763.
99. Mondal S., Anand M., Badigannavar G., Murty S. (2007), "RAPD markers linked to a rust resistance gene in cultivated groundnut (*Arachis hypogaea* L.)", *Euphytica* 159: 233-239.
100. Muler A. J. (1983), "Genetic analysis of nitrate reductase deficient tobacco plants regenerated from mutant cells. Evidence for duplicate structural gene", *Mol Gen Genet* 192: 275-281.

101. Muthusamy A., Vasanth K., Sivasankari R.I., Chandrasekar B.R., Jayabalan N. (2007), "Effects of mutagens on somatic embryogenesis and plant regeneration in groundnut", *Biologia Plantarum* 51 (3): 430-435.
102. Muntz K., Shutov D. A. (2002), "Legumains and their function in plants. *Trend Plant Sci* 7 (8): 340-344.
103. Nagata K., Kudo N., Abe K., Arai S., Tanokura M.. (2000), "Three dimensional solution structure of oryzacystatin-I, a cysteine proteinase inhibitor of rice, *Oryza sativa L. japonica*", *Biochemistry*, 39: 14753- 14760.
104. Nakazawa Y., Sato H., Uchino M., Takano K. (2006), "Purification, characterization and cloning of phospholipase D from peanut seeds", *Protein J.* 25(3):23-212.
105. Nissen M.S., Kumar G.N., Youn B, Knowles D. B, Lam K. S. Ballinger W. J, . Knowles N. R, Kang C. (2009), "Characterization of *solanum tuberosum* multicystatin and its structural comparison with other cystatins", *The Plant Cell* 21: 861-875.
106. Oliveira A. S., Filho J. X., Sales M. P. (2003), "Cysteine proteinases and cystatins", *Braz. arch. biol. technol* 46 (1): 91-104.
107. Pierr J., Lagoda (2006), "Plant breeding cation and genetics newsletter", *ISS (16): 1564-2596*. <http://www-naweb.iaea.org/nafa/index.html>.
108. Rao N. R. C., Udaykumar M., Farquhar G. D., Talwar H. S., Prasad T. G. (1995), "Variation in carbon isotope discrimination and its relationship to specific leaf area and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase content in groundnut genotypes". *Australian Journal of Plant Physiology* 22: 545-551.
109. Rawlings N. D., Morton F. R., Kok C. Y., Kong J., Barrett A. J. (2008), "*MEROPS*: the peptidase database". *Nucleic Acids Res.* 36: 320–325.
110. Rorat T. (2006), "Plant dehydrins--tissue location, structure and function". *Cell Mol Biol Lett.* 11(4): 56- 536.

111. Riduan A., Aswidinnor H., Koswara J., Sudarsono S. (2005), "Tolerance of several peanut cultivars against drought stress", *The Indonesian Biological Society & Bogor Agricultural University*, 12(1): 28-34.
112. Safadi A., Elias R. (2011), "Improvement of caper (*Catrangaris spinosa* L.) propagation using *in vitro* culture and gamma irradiation", *Scientia Horticulturae*, ISSN: 0304-4238, 127(3): 290-297.
113. Sakuma Y., Maruyama K., Osakabe Y., Qin F., Seki M., Shinozaki K., Yamaguchi S. K. (2006), "Function analysis of an *Arabidopsis* transcription factor, DREB2a, involved in drought responsive gene expression", *The Plant Cell* 18: 1292-1309.
114. Sambrook J., Russell D.W. (2001), "*Molecular cloning a laboratory manual*" 3rd edition, Cold Spring Haror Laboratory Press.
115. Sato N., Ishidoh K., Uchiyama Y., K. E. (1990), "Molecular cloning and sequencing of cDNA for rat cystatin b", *Nucleic Acids Res* 18 (22): 66-98.
116. Seo P. J., Xiang F., Qiao M., Park J.Y., Lee Y.N, Kim S.G., Lee Y.H., Park W.J., Park C.M. (2009) "The MYB96 transcription factor mediates abscisic acid signaling during drought stress response in *Arabidopsis*". *Plant Physiol.* 151, 275–289.
117. Singh K. P., Sehrawat A. R., Neeelam Y., Sanjogta U. (2004), "*In vitro* callus growth, selection of NaCl tolerant cell lines and plant regeneration in wheat", *National Journal of Plant Improvement (India)* 6 (2): 130-131.
118. Simova-Stoilova L., Vaseva I., Grigorova B., Demirevska K., Feller U. (2010), "Proteolytic activity and cysteine protease expression in wheat leaves under severe soil drought and recovery", *Plant Physiol Biochem* 48, (2-3): 200-206.
119. Songsri P., Jogloy S., Holbrook C.C., Kesmala T., Vorasoot N., Akkasaeng C., Patanothai A. (2009), "Association of root, specific leaf area and SPAD

- chlorophyll meter reading to water use efficiency of peanut under different available soil water", *Agricultural Water Management* 96: 790 – 798.
120. Songsri P., Jogloy S., VorasootN., Akkasaeng C., Patanothai A., Holbrook C. C. (2008), "Root distribution of drought-resistant peanut genotypes in response to drought", *Agronomy & Crop Science*, 92-103.
 121. Sudheer D. V., Pamidimarri N., Singh S., Mastan S. G., Patel A., Redy M. P. (2008), "Molecular characterization and identification of markers for toxic and non-toxic varieties of *Jatropha curcas L.* using RAPD, AFLP and SSR markers", *Molecular Biology Report*, 18: 320-326.
 122. Su L., Zhao C.Z., Wang X.J., Wan S.B., Bi Y.P. (2010), "Cloning and analysis of peanut (Luhua14) *AhLEA* genes", Accession: HM543575, HM543577, HM543584, HM543585, HM543588, HM543589, HM543590, HM543591.
 123. Towil L.E., Mazur P. (1975), "Studies on the reduction of 2,3,5- triphenyl tetrazolium chloride as a viability assay for plant tissue cultures", *Can J Bot* 53: 1097-1102.
 124. Turk B., Turk V., Turk D. (1997), "Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors", *Biol. Chem.* 378: 141-150.
 125. Valdes R. S., Guerrero R. A., Melgoza V. C., Chagolla L. A., Delgado V. F., Martinez G. N., Sanchez H. N., Delano F. J. (2007), "Cloning of a cDNA encoding a cystatin from grain amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) showing a tissue-specific expression that is modified by germination and abiotic stress", *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 790- 798.
 126. Wang X. (2005), "Regulatory functions of phospholipase D and phosphatidic acid in plant growth, development, and stress responses", *Plant Physiol.* 139(2): 566–573.
 127. Wan X. R., Li L. (2006), "Regulation of ABA level and water-stress tolerance of *Arabidopsis* by ectopic expression of a peanut 9-cis-

- poxycarotenoid dioxygenase gene", *Biochemical and Biophysical Research Communications* 347: 1030–1038.
128. Wan X. R., Li L. (2005), "Molecular cloning and characterization of a dehydration-inducible cDNA encoding a putative 9-cis-epoxy-carotenoid dioxygenase in *Arachis hypogaea* L." *Mitochondrial DNA*, 16(3): 217-223.
 129. William J. G., Kubelik A. R., Livak K. J., Rafalski J. A., Tingey S. V. (1990), "DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers", *Nucleic Acids Research* 18 (22): 6531-6535.
 130. Yadav P. V., Suprasana P., Gopalrao K. U., Anant B. V. (2006), "Molecular profiling using RAPD technique of salt and drought tolerance regenerants of sugarcane", *Sugar Tech* 8 (1): 63-68.
 131. Ying Si Y., Zhang C., Meng S., Dane F. (2009), "Gene expression changes in response to drought stress in *Citrullus colocynthis*", *Plant Cell Report* 28: 997-1009.
 132. Zhang X., Liu S., Takano T. (2008), "Two cysteine proteinase inhibitors from *Arabidopsis thaliana*, AtCYSa and AtCYSb, increasing the salt, drought, oxidation and cold tolerance", *Plant Mol Biol* 68 (1-2): 43-131.
 133. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/nuccore/EU723567>
 134. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/nuccore/AY722693>
 135. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/nuccore/S49967>
 136. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/nuccore/AY390352>
 137. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/nuccore/AB125973>
 138. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/nuccore/AM712476>
 139. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/nuccore/Y12068>
 140. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/nuccore/X57658>
 141. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/nuccore/D63342>
 142. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/nuccore/D64115>
 143. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/nuccore/AAA33903>
 144. <http://www.gso.gov.vn>.
 145. <http://www.faostat.fao.org/site/567/desktopdefault.aspx?pageID=569>

Phụ lục 1. Đoạn mã hoá của gen cystatin ở một số giống cây trồng

STT	Tên khoa học	Tên thường dùng	Mã số	số nucleotide	Năm công bố	Tài liệu trích dẫn
1	<i>Arachis hypogaea</i>	Giống lạc L18	FN811133	297	2010	
2	<i>Arachis hypogaea</i>	Dòng chọn lọc R46	HE578279	297	2011	
3	<i>Arachis hypogaea</i>	Dòng chọn lọc RM48	FR745399	297	2010	
4	<i>Arachis hypogaea</i>	Giống lạc L23	FR691053	297	2010	
5	<i>Arachis diogeni</i>	Lạc	EU723567	297	2008	133
6	<i>Arachis hypogaea</i>	Lạc	AY722693	297	2004	134
7	<i>Oryza sativa</i> (OCI)	Lúa	S49967	309	1993	135
8	<i>Actinidia deliciosa</i>	kiwi	AY390352	351	2004	136
9	<i>Oryza sativa japonica group</i> (gKOCIII)	Lúa	AB125973	327	2008	137
10	<i>Vigna radiata</i>	Đậu xanh (MN93)	AM712476	267	2007	138
11	<i>Hordeum vulgare subsp</i>	Đại mạch	Y12068	327	2005	139

Phụ lục 2. Trình tự 25 môi của phản ứng RAPD

TT	Tên môi	Trình tự (5'->3')
1.	OPA1	TCCACGGGCA
2.	OPA2	CACCATCGTG
3.	OPA3	CCTGGGTCCA
4.	OPA4	ACCCAGGTTG
5.	OPA5	GTGACCAGAG
6.	OPA6	GACGACCGCA
7.	OPA7	CTTCGCTGTC
8.	OPA8	CCGCCGGTAA
9.	OPA9	CCGCGTTGAG
10.	OPA10	ACGCGAACCT
11.	OPA11	AGCCAAGGAC
12.	OPA12	TTCCCGCACT
13.	OPA13	ACCCTGAGGA
14.	OPA14	CAAGCCGTGA
15.	OPA15	GTGGATCGTC
16.	OPB05	CAGAGGTTCC
17.	OPB10	GACCAGAGGT
18.	OPH04	GGCTCTGGGT
19.	OPH08	GGGATAAGGG
20.	OPF09	ACGGCAATGG
21.	OPF10	CCCGAGAAAC
22.	OPN05	GGTTGGGCCA
23.	OPQ02	GACCAGCCCA
24.	OPQ05	CCCGAAGCAA
25.	UPC348	CACGGCTTCC

Phụ lục 3. Kỹ thuật trồng lạc thu đông không dùng công nghệ che phủ nilon

- Thời vụ gieo trồng: Lạc thu đông có thể gieo trồng từ 15/8 – 30/9, tốt nhất từ 15/8 – 10/9.

- Chọn đất : Chọn đất cát pha thịt nhẹ chủ động tưới tiêu và dễ thoát nước. Làm đất nhỏ, sạch cỏ dại, tỷ lệ hạt đất có đường kính nhỏ hơn 1cm chiếm trên 70%, lên luống rộng 90cm, cao 15cm, rãnh rộng 25cm. Nếu đất ướt có thể áp dụng phương pháp làm đất tối thiểu.

- Phân bón và phương pháp bón phân

– Liều lượng phân bón (tính cho 1 sào Bắc bộ)

Phân chuồng hoai: 300 – 350kg

Phân lân super: 15 – 20kg

Đạm urê: 2,5 – 3kg.

Kali clorua: 4 – 5kg

Vôi bột: 20kg

– Phương pháp bón phân:

+ Bón lót : 100% PC + 100% lân + 50% đạm vào các hàng đã rạch.

+ Bón thúc lần 1: Lúc cây lạc được 2 –3 lá thật bón 50% lượng đạm kết hợp với xới phá váng tạo điều kiện cho vi sinh vật nốt sần hoạt động.

+ Bón thúc lần 2: Khi cây lạc được 6 – 7 lá thật, bón toàn bộ lượng kali.

+ Bón thúc lần 3: Khi cây tắt hoa, bón 50% lượng vôi còn lại, kết hợp với vun cao luống chống đổ và tạo đất tơi xốp, thuận lợi cho cây lạc đâm tia, làm củ.

Mật độ, khoảng cách và phương pháp gieo hạt

Mật độ trung bình từ 34 – 36 cây/m². Khoảng cách thích hợp từ 18 – 20cm x 30cm. Tiến hành rạch 3 hàng dọc theo luống ở độ sâu 3 – 4cm rồi gieo hạt, gieo 2 hạt/hốc theo khoảng cách như trên. Nếu áp dụng phương pháp làm đất tối thiểu phải sử dụng đất mượn bằng cách trộn phân chuồng (đã được ủ với lân) với trấu và đất bột hoặc đất hun để phủ lên trên hạt sau khi gieo (gieo hốc với khoảng cách như trên).

Một số biện pháp kỹ thuật khác

– Lạc cần được phơi lại trên nong, nia, dưới nắng nhẹ 2 ngày trước khi gieo (phơi cả củ).

– Chọn những hạt tốt để gieo, hạt cần được ngâm nảy mầm trước khi gieo...

– Phun Boocdo 1%, Zinep 0,3%, Danconil 0,2% khi thấy có biểu hiện của bệnh gỉ sắt, đốm lá.

– Phun Padan 95SP, Opatox, Beettox khi thấy lạc bị sâu xanh, sâu khoang, bọ trĩ, bọ phấn hay rệp muội gây hại.

Thu hoạch:

Thu hoạch lạc khi có từ 80 – 90% số củ già. Sau khi thu hoạch cần gom nilon lại một chỗ và đốt, tránh ô nhiễm môi trường .

<http://agriviet.com/nd/724-cach-trong-lac-dau-phong-thu-dong-dat-nang-suat-cao/>[17 - Aug - 2007]

Phụ lục 4. Hoạt độ của α -amylase và hàm lượng đường của 10 giống lạc trong điều kiện hạn sinh lý

Tên giống lạc	Hoạt độ của α -amylase ở thời điểm gây hạn (ĐVHD/ mg hạt nảy mầm/30'/30 ⁰ C)				Hàm lượng đường khử ở thời điểm gây hạn (% mg hạt nảy mầm)			
	3 ngày	5 ngày	7 ngày	9 ngày	3 ngày	5 ngày	7 ngày	9 ngày
	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$
L05	0,17 ± 0,01	0,43 ± 0,08	0,60 ± 0,06	0,56 ± 0,03	2,79 ± 0,21	6,16 ± 0,86	6,52 ± 0,64	4,68 ± 0,71
L16	0,41 ± 0,05	0,44 ± 0,03	0,48 ± 0,01	0,27 ± 0,02	1,29 ± 0,02	3,24 ± 0,57	4,90 ± 0,22	3,31 ± 0,27
L18	0,29 ± 0,05	0,35 ± 0,01	0,48 ± 0,01	0,22 ± 0,01	2,47 ± 0,52	2,50 ± 1,33	4,96 ± 0,45	4,56 ± 0,56
L23	0,42 ± 0,01	0,44 ± 0,03	0,52 ± 0,02	0,35 ± 0,03	2,78 ± 0,03	5,60 ± 1,05	6,53 ± 0,56	5,18 ± 1,05
L24	0,11 ± 0,01	0,38 ± 0,04	0,48 ± 0,04	0,45 ± 0,06	1,46 ± 0,25	4,05 ± 0,48	4,24 ± 0,21	2,78 ± 0,24
MD7	0,19 ± 0,01	0,36 ± 0,03	0,44 ± 0,02	0,40 ± 0,05	1,73 ± 0,02	3,25 ± 0,66	4,10 ± 0,35	3,51 ± 0,66
MD9	0,11 ± 0,01	0,48 ± 0,02	0,56 ± 0,11	0,46 ± 0,07	2,09 ± 0,33	5,18 ± 0,90	7,79 ± 0,36	5,29 ± 0,42
SD30	0,37 ± 0,02	0,42 ± 0,04	0,55 ± 0,10	0,31 ± 0,07	1,90 ± 0,03	6,46 ± 0,75	6,76 ± 0,34	0,44 ± 0,38
V79	0,48 ± 0,04	0,51 ± 0,02	0,70 ± 0,05	0,59 ± 0,03	1,50 ± 0,22	4,09 ± 0,40	3,86 ± 0,54	2,93 ± 0,45
Đỏ BG	0,31 ± 0,04	0,42 ± 0,04	0,44 ± 0,03	0,17 ± 0,01	1,54 ± 0,33	2,83 ± 0,61	3,10 ± 0,29	2,85 ± 0,35

Phụ lục 5. Tỷ lệ cây sống, cây phục hồi và chỉ số chịu hạn tương đối của 10 giống lạc trong điều kiện gây hạn nhân tạo

Tên giống lạc	% CKH sau 1 ngày hạn	% CKH sau 3 ngày hạn	% CKH sau 5 ngày hạn	% CHP sau 1 ngày hạn	% CHP sau 3 ngày hạn	% CHP sau 5 ngày hạn	Chỉ số chịu hạn tương đối	Xếp thứ tự
L05	70,5	58,4	31,2	31,0	31,2	52,0	5699,35	3
L16	69,5	49,1	33,5	32,5	33,5	50,5	5385,08	3
L18	56,7	33,5	25,3	26,7	43,3	40,5	3736,30	4
L23	80,5	61,5	45,3	30,5	45,3	50,5	7297,52	1
L24	68,5	52,0	33,5	25,0	35,0	52,5	5391,12	3
MD7	66,7	52,3	34,4	30,1	32,5	52,7	5425,24	3
MD9	66,0	55,4	32,7	31,5	32,0	51,8	5448,35	3
SD30	68,5	56,0	28,5	27,6	37,6	49,5	5416,26	3
V79	70,5	60,1	28,0	27,5	28,0	48,8	5311,62	3
Đỏ BG	76,7	56,6	49,5	28,5	39,0	51,4	6760,26	2

Phụ lục 6. Hoạt độ của α - amylase và hàm lượng đường trong điều kiện hạn sinh lý của các giống và dòng chọn lọc ở thế hệ thứ Năm

Tên dòng và giống lạc	Hoạt độ α amylase ở thời điểm gây hạn				Hàm lượng đường khử ở thời điểm gây hạn			
	3 ngày	5 ngày	7 ngày	9 ngày	3 ngày	5 ngày	7 ngày	9 ngày
	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$	$\bar{X} \pm S_{\bar{X}}$
R44	0,18 \pm 0,01	0,42 \pm 0,06	0,48 \pm 0,04	0,14 \pm 0,02	0,94 \pm 0,04	1,22 \pm 0,01	1,23 \pm 0,05	0,85 \pm 0,07
R46	0,19 \pm 0,01	0,52 \pm 0,05	0,63 \pm 0,04	0,19 \pm 0,03	1,07 \pm 0,04	1,21 \pm 0,03	1,74 \pm 0,12	0,93 \pm 0,03
R48	0,19 \pm 0,02	0,50 \pm 0,03	0,54 \pm 0,04	0,19 \pm 0,05	1,05 \pm 0,13	1,15 \pm 0,02	1,40 \pm 0,14	0,98 \pm 0,09
RM46	0,20 \pm 0,01	0,45 \pm 0,04	0,60 \pm 0,02	0,25 \pm 0,03	1,30 \pm 0,03	1,24 \pm 0,04	1,37 \pm 0,03	0,77 \pm 0,10
RM47	0,20 \pm 0,04	0,53 \pm 0,05	0,58 \pm 0,04	0,21 \pm 0,05	1,17 \pm 0,13	1,32 \pm 0,06	1,45 \pm 0,09	1,16 \pm 0,09
RM48	0,23 \pm 0,01	0,54 \pm 0,02	0,66 \pm 0,07	0,20 \pm 0,04	1,42 \pm 0,05	1,51 \pm 0,08	1,81 \pm 0,10	0,59 \pm 0,03
RM49	0,15 \pm 0,04	0,47 \pm 0,02	0,55 \pm 0,03	0,23 \pm 0,02	0,93 \pm 0,18	1,14 \pm 0,02	1,28 \pm 0,02	0,93 \pm 0,04
L18	0,20 \pm 0,03	0,52 \pm 0,06	0,53 \pm 0,02	0,23 \pm 0,06	1,07 \pm 0,03	1,14 \pm 0,02	1,38 \pm 0,07	0,95 \pm 0,02
L23	0,22 \pm 0,01	0,47 \pm 0,03	0,59 \pm 0,01	0,26 \pm 0,02	1,11 \pm 0,02	1,28 \pm 0,03	1,51 \pm 0,03	0,77 \pm 0,04
ĐVT	<i>ĐVHD/ mg hạt nảy mầm/30'/30⁰C</i>				<i>% mg hạt nảy mầm</i>			

