

ĐẠI HỌC HUẾ
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

PHÙNG THỊ BÍCH HÒA

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG KHÁNG BỆNH HÉO RŨ
GỐC MỐC TRẮNG CỦA CÂY LẠC (*Arachis hypogaea* L.)
ĐƯỢC CHUYỂN GEN *Chi42*

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

HUẾ, 2023

ĐẠI HỌC HUẾ
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

PHÙNG THỊ BÍCH HÒA

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG KHÁNG BỆNH HÉO RŨ
GỐC MỐC TRẮNG CỦA CÂY LẠC (*Arachis hypogaea* L.)
ĐƯỢC CHUYỂN GEN *Chi42*

Ngành: SINH LÝ HỌC THỰC VẬT

Mã số: 9420112

LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học:

1. GS. TS. NGUYỄN HOÀNG LỘC
2. TS. NGUYỄN XUÂN HUY

HUẾ, 2023

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan luận án là công trình nghiên cứu của tôi dưới sự hướng dẫn của GS.TS. Nguyễn Hoàng Lộc và TS. Nguyễn Xuân Huy. Các số liệu và kết quả nghiên cứu trong luận án là trung thực. Một phần kết quả của luận án đã được công bố trên các tạp chí và hội nghị khoa học chuyên ngành với sự đồng ý và cho phép của các đồng tác giả, phần còn lại chưa công bố trong bất kỳ công trình nào khác. Những trích dẫn về bảng, hình, kết quả nghiên cứu của những tác giả khác, tài liệu sử dụng trong luận án đều ghi rõ nguồn gốc và trích dẫn theo đúng quy định.

Thừa Thiên Huế, ngày 06 tháng 03 năm 2023

Tác giả

Phùng Thị Bích Hòa

LỜI CẢM ƠN

Hoàn thành luận án này, em xin bày tỏ lòng biết ơn đối với tất cả những cá nhân và tổ chức có liên quan, những người trực tiếp hoặc gián tiếp giúp đỡ em trong suốt ba năm qua.

“Bạn không thể thành danh nếu không có sự giúp đỡ của giáo viên”. Đầu tiên, em xin gửi lời cảm ơn chân thành của em dành cho hai Thầy giáo là GS. TS. Nguyễn Hoàng Lộc và TS. Nguyễn Xuân Huy, các thầy đã tận tình chỉ bảo và nhẫn nại với em trong suốt ba năm qua, đã giúp em hoàn thành luận án này và thực sự đã đưa em vào thế giới khoa học. Hai thầy đã hướng dẫn em hoàn thành và bố trí các thí nghiệm, dẫn dắt trong từng nội dung của luận án, hoàn thành các đề xuất nghiên cứu và tất cả các chương của luận án này.

Tiếp theo, em muốn gửi lời cảm ơn đặc biệt đến Thầy giáo TS. Nguyễn Quang Đức Tiến, người Thầy, người Anh tuyệt vời, đã hướng dẫn em trong những ngày đầu tiên hành các thí nghiệm của luận án, các thí nghiệm về *in vitro* cây lạc và biểu hiện tạm thời gen chitinase ở cây thuốc lá. Người luôn dành cho em những lời động viên chân thành và đầy cởi mở.

Em cũng dành lời cảm ơn đến Thầy giáo TS. Nguyễn Ngọc Lương, Thầy đã hướng dẫn, thiết kế thí nghiệm tạo kháng thể đa dòng trên chuột và tạo điều kiện chia sẻ một số hóa chất, thiết bị nghiên cứu.

Em xin gửi lời cảm ơn chân thành đến Cô giáo TS. Lê Thị Hà Thanh, người bạn, người đồng nghiệp rất chân thành, đã tạo điều kiện và ủng hộ về tinh thần cho em rất nhiều trong quá trình hoàn thiện luận án.

Em muốn gửi lời cảm ơn đến Thầy giáo TS. Nguyễn Minh Trí, Thầy đã giúp đỡ em rất nhiều trong các buổi bảo vệ chuyên đề và các thủ tục hồ sơ giấy tờ để em có thể bảo vệ thành công luận án.

Em cũng xin gửi lời cảm ơn đến anh Nguyễn Tấn Vũ, anh đã tạo mọi điều kiện về hóa chất và thiết bị thí nghiệm trong suốt ba năm qua để em có thể hoàn thành luận án này.

Em xin gửi lời cảm ơn đến Ban Giám đốc, Ban Đào tạo và Công tác Sinh viên Đại học Huế, Ban Lãnh đạo Khoa Sinh học và phòng Đào tạo Sau Đại học, Trường Đại học Khoa học; Ban Giám hiệu; Ban Lãnh đạo Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế đã có nhiều giúp đỡ quý báu, tạo mọi điều kiện tốt nhất để em hoàn thành luận án.

Tôi cũng muốn gửi lời cảm ơn đến Kỹ sư Nguyễn Hoàng Tuệ, người em đã đồng hành và giúp đỡ tôi rất nhiều trong toàn bộ thời gian thực hiện luận án và các thí nghiệm của luận án.

Tôi cũng gửi lời cảm ơn đến các em sinh viên ngành Công nghệ sinh học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế đã hỗ trợ tôi rất nhiều trong quá trình thực hiện các thí nghiệm của luận án, đã đồng hành cùng tôi suốt thời gian làm luận án (Nguyễn Thị Hằng (K38), Đặng Văn Thành, Hoàng Anh Thi, Trần Gia Cát Tường, Phạm Thị Huyền Trang (K39), Huỳnh Thị Quỳnh Trang, Hoàng Anh Thư, Nguyễn Ngọc Huyền Nhung, Nguyễn Thanh Nhân, Lục Hoàng Linh, Huỳnh Thị Thu Hà, Hồ Thị Len (K40), Ths. Trần Quý Đức (K36), Huỳnh Kim Vũ, Nguyễn Thị Thanh Tuyên, Hoàng Lan Phương, Nguyễn Thị Trang, (K41)) và các em sinh viên Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế Khóa 2017 - 2021.

Em xin gửi lời cảm ơn chân thành đến Quỹ Đồi mới sáng tạo Vingroup (VINIF) đã hỗ trợ một phần kinh phí cho em thực hiện luận án này.

Em xin bày tỏ lòng biết ơn đến quý thầy cô giáo, các anh chị em đồng nghiệp, các anh chị em học viên, sinh viên đã động viên, quan tâm và giúp đỡ em trong suốt quá trình thực hiện luận án.

Xin gửi đến bố và mẹ yêu quý của con những lời biết ơn chân thành nhất. Bố mẹ luôn ở bên cạnh con để chia sẻ những thành công của con.

Cuối cùng nhưng không kém phần quan trọng, tôi xin gửi lời cảm ơn đến người chồng yêu quý và hai con đã luôn bên cạnh động viên, khuyến khích, là niềm tự hào của tôi.

Một lần nữa xin cảm ơn về tất cả.

Phùng Thị Bích Hòa

MỤC LỤC

LỜI CAM ĐOAN.....	i
LỜI CẢM ƠN.....	ii
MỤC LỤC.....	iv
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT.....	vii
KÝ HIỆU VIẾT TẮT CÁC VECTOR MANG GEN CHITINASE.....	x
DANH MỤC HÌNH.....	xi
DANH MỤC BẢNG.....	xiv
MỞ ĐẦU.....	1
1. Lý do chọn đề tài.....	1
2. Mục tiêu nghiên cứu.....	2
3. Nội dung nghiên cứu.....	2
4. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn.....	3
5. Những đóng góp mới của luận án.....	3
CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN CÁC VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU.....	4
1.1. Bệnh héo rũ gốc mốc trắng do nấm <i>Sclerotium rolfii</i> gây ra và biện pháp phòng trừ.....	4
1.1.1. Cây lạc.....	4
1.1.2. Các bệnh hại do nấm gây ra ở cây lạc.....	5
1.1.3. Bệnh héo rũ gốc mốc trắng do nấm <i>S. rolfii</i>	5
1.1.4. Cơ chế kháng nấm bệnh của cây lạc.....	10
1.1.5. Tình hình nghiên cứu các biện pháp phòng trừ bệnh do <i>S. rolfii</i> gây ra ở cây lạc trên thế giới và Việt Nam.....	12
1.2. Enzyme chitinase.....	16
1.2.1. Sự phân bố chitinase trong tự nhiên.....	16
1.2.2. Phân loại chitinase.....	17
1.2.3. Cơ chế phản ứng của chitinase.....	18
1.2.4. Tình hình nghiên cứu chitinase từ <i>Trichoderma</i>	19
1.3. Cải thiện khả năng kháng nấm của cây lạc bằng kỹ thuật chuyển gen.....	23
1.3.1. Hệ thống vector trong biến nạp gen thông qua <i>A. tumefaciens</i>	23
1.3.2. Các promoter sử dụng trong chuyển gen thực vật.....	24
1.3.3. Tình hình nghiên cứu về promoter đặc hiệu rễ.....	25
1.3.4. Thay đổi mã di truyền của gen đích cho phù hợp với hệ thống biểu hiện.....	27
1.4. Ứng dụng kỹ thuật chuyển gen nhằm tăng cường khả năng kháng nấm ở cây lạc.....	27
1.4.1. Hệ thống tái sinh và quy trình chuyển gen ở cây lạc.....	27

1.4.2. Tình hình nghiên cứu chuyển gen chitinase vào cây lạc nhằm nâng cao khả năng kháng nấm.....	29
CHƯƠNG 2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU.....	31
2.1. Nguyên liệu nghiên cứu.....	31
2.1.1. Nguyên liệu thực vật.....	31
2.1.2. Các vector, chủng vi khuẩn và vi nấm	32
2.2. Phương pháp nghiên cứu.....	33
2.2.1. Hoàn thiện hệ thống tái sinh <i>in vitro</i> giống lạc L14.....	35
2.2.2. Tối ưu hóa trình tự gen <i>Chi42</i>	35
2.2.3. Sản xuất kháng thể đa dòng kháng chitinase 42 kDa.....	36
2.2.4. Xác định hoạt tính và đặc điểm của Ta-CHI42	38
2.2.5. Tạo dòng gen chitinase và promoter <i>Asy</i> trong vector biểu hiện thực vật.....	39
2.2.6. Tam hợp.....	39
2.2.7. Chuyển gen chitinase bằng kỹ thuật thâm nhập.....	41
2.2.8. Biến nạp gen chitinase thông qua <i>Agrobacterium</i>	41
2.2.9. Nhận dạng và phân tích biểu hiện của gen chuyển	42
2.2.10. Thử nghiệm hoạt tính kháng nấm của chitinase thực vật.....	43
2.2.11. Đặc điểm sinh lý và hóa sinh của cây lạc chuyển gen <i>in vivo</i>	44
2.2.12. Xử lý thống kê	47
2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu	47
CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN.....	48
3.1. Hoàn thiện hệ thống tái sinh <i>in vitro</i> ở cây lạc.....	48
3.1.1. Ảnh hưởng của điều kiện khử trùng đến khả năng nảy mầm <i>in vitro</i> của hạt.....	48
3.1.2. Ảnh hưởng của phương thức nảy mầm	49
3.1.3. Khả năng tái sinh chồi từ các bộ phận khác nhau của cây lạc <i>in vitro</i>	50
3.1.4. Ảnh hưởng của BAP lên tái sinh chồi <i>in vitro</i> từ trụ trên lá mầm	51
3.1.5. Ảnh hưởng của BAP lên tái sinh chồi <i>in vitro</i> từ lá mầm	52
3.1.6. Ảnh hưởng của NAA và IBA lên khả năng tạo rễ của chồi <i>in vitro</i>	53
3.2. Sản xuất kháng thể đa dòng kháng chitinase ở chuột.....	54
3.2.1. Tổng hợp các gen chitinase	54
3.2.2. Tạo dòng các gen chitinase trong vector biểu hiện <i>E. coli</i> pQE30	55
3.2.3. Biểu hiện các gen chitinase trong <i>E. coli</i>	55
3.2.4. Sản xuất kháng thể đa dòng kháng Ta-CHI42	56
3.2.5. Hoạt tính thủy phân chitin của Ta-CHI42.....	58
3.2.6. Đặc điểm của enzyme Ta-CHI42	59
3.2.7. Hoạt tính kháng nấm <i>in vitro</i> của Ta-CHI42.....	62
3.3. Thiết kế các cấu trúc biểu hiện chitinase ở thực vật	63

3.3.1. Tạo dòng gen chitinase vào vector pMYV719.....	63
3.3.2. Tạo dòng gen chitinase và promoter Asy vào vector pMYV719.....	66
3.3.3. Tạo vi khuẩn <i>A. tumefaciens</i> LBA4404 mang gen chitinase	68
3.4.1. Biểu hiện của các gen chitinase.....	69
3.4.2. Hoạt tính thủy phân chitin của Ta-CHI42	70
3.4.3. Hoạt tính kháng nấm của enzyme Ta-CHI42 trong điều kiện <i>in vitro</i>	74
3.5. Ảnh hưởng của một số yếu tố lên hiệu quả chuyển gen chitinase vào cây lạc qua trung gian <i>A. tumefaciens</i>	77
3.5.1. Ảnh hưởng của thời gian tiền nuôi cấy	77
3.5.2. Ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn	77
3.5.3. Ảnh hưởng của thời gian lây nhiễm	78
3.5.4. Ảnh hưởng của thời gian đồng nuôi cấy	78
3.5.5. Ảnh hưởng của nồng độ acetosyringone	79
3.5.6. Ảnh hưởng của nồng độ kanamycin.....	79
3.5.7. Ảnh hưởng của nồng độ cefotaxime.....	80
3.6. Biến nạp gen chitinase vào cây lạc thông qua <i>A. tumefaciens</i>	81
3.6.1. Chuyển gen chitinase vào cây lạc.....	81
3.6.2. Sàng lọc các cây lạc chuyển gen bằng PCR.....	84
3.6.3. Biểu hiện các gen chitinase trong cây lạc.....	86
3.6.4. Hoạt tính thủy phân chitin của chitinase	88
3.6.5. Hoạt tính kháng nấm của các dòng lạc chuyển gen	91
3.7. Đặc điểm sinh lý và hóa sinh của cây lạc chuyển gen sinh trưởng <i>in vivo</i>	94
3.7.1. Chọn giá thể thích hợp.....	94
3.7.2. Đặc điểm sinh lý	98
3.7.3. Đặc điểm hóa sinh	109
KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ	113
1. Kết luận.....	113
2. Kiến nghị	114
CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN	115
TÀI LIỆU THAM KHẢO	117
PHỤ LỤC	

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VÀ CHỮ VIẾT TẮT

2,4-D	: 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid
Amp	: Ampicillin
ANOVA	: Analysis of variance
APS	: Ammonium persulfate
AS	: Acetosyringone
Asp	: Aspartic acid
BA	: N6-Benzyl adenin
BAP	: Benzylaminopurine
BCIP	: 5-bromo, 4-chloro, 3-indolyl phosphate
bp	: Base pair
CA	: Cetrimide agar
cal	: Calories
Cf	: Cefotaxime
Chl	: Chlorophyll
COOL	: Codon Optimization OnLine
CRAG	: Centre for Research in Agricultural Genomics
cs	: Cộng sự
CTAB	: Cetyltrimethylammonium bromide
DMSO	: Dimethylsulfoxide
DNA	: Deoxyribonucleic acid
dNTP	: Deoxynucleoside triphosphate
DNS	: 3,5-Dinitrosalicylic acid
dp35S	: Duplicated 35S promoter
ĐHST	: Điều hòa sinh trưởng
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid
F	: Forward primer
Glu	: Glutamic acid
ha	: Hecta
HgCl ₂	: Thủy ngân (II) chloride
IAA	: 3-Indoleacetic acid

IBA	: Indole-3-butyric acid
IPTG	: Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
2-iP	: 2-Isopentenyladenine
ISSR	: Inter-Simple Sequence Repeats - (Chuỗi lặp lại đơn giản bên trong)
Km	: Kanamycin
kb	: Kilobase pair
kDa	: Kilo Daltons
KIN	: Kinetin
KTST	: Kích thích sinh trưởng
MES	: 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
mRNA	: Messenger ribonucleic acid (RNA thông tin)
MS	: Murashige và Skoog
MW	: Khối lượng phân tử
NAA	: α -Naphthaleneacetic acid
NaOCl	: Sodium hypochlorite
NBT	: Nitro-blue tetrazolium
NC	: Negative control (đối chứng âm tính)
Nxb	: Nhà xuất bản
OD	: Optical density (mật độ quang)
PBS	: Phosphate-buffered saline
PC	: Positive control (đối chứng dương tính)
PCA	: Potato glucose carot
PDA	: Potato dextrose agar
PDB	: Potato dextrose broth
PCR	: Polymerase chain reaction
PGA	: Potato-glucose-agar
Phe	: Phenylalanine
pNP- β -GlcNAc	: 4-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide
R	: Reverse primer
RNA	: Ribonucleic acid
RT- qPCR	: Reverse transcription - Quantitative PCR
SDS-PAGE	: Sodium dodecyl sulphate - polyacrylamide gel electrophoresis

T ₀	: Thệ hệ cây chuyển gen đầu tiên
TBS	: Tris buffered saline
TBST	: Tris-buffered saline with Tween 20 (Đệm Tris có Tween 20)
TDZ	: Thidiazuron
TEMED	: Tetramethylethylenediamine
TGST	: Thời gian sinh trưởng
TMN	: Tris-MgCl ₂ -NaCl buffer
TNHH MTV	: Trách nhiệm hữu hạn một thành viên
tRNA	: Transfer RNA
Trp	: Tryptophan
Tyr	: Tyrosine
U	: Unit
UV	: Ultraviolet
w/v	: Weight/Volume
YEP	: Yeast extract peptone (cao chiết nấm men)

KÝ HIỆU VIẾT TẮT CÁC VECTOR MANG GEN CHITINASE

Tên vector	Vector mang gen chitinase	Promoter	
pNHL19.1	pMYV719/ <i>Chi42</i>	Biểu hiện thường trực (dp35S)	
pNHL19	pNHL19.2		pMYV719/ <i>syncodChi42-1</i>
pNHL19.3	pMYV719/ <i>syncodChi42-2</i>		
pNHL20.1	pMYV719/ <i>Asy/Chi42</i>	Biểu hiện đặc hiệu rễ (pAsy)	
pNHL20	pNHL20.2		pMYV719/ <i>Asy/syncodChi42-1</i>
pNHL20.3	pMYV719/ <i>Asy/syncodChi42-2</i>		

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Cấu trúc đại diện của 4 loại nấm bệnh hại lạc	6
Hình 1.2. Triệu chứng bệnh hại trên cây lạc do <i>S. rolf sii</i> gây ra.....	7
Hình 1.3. Chu kỳ bệnh héo rũ gốc mốc trắng trên lạc do <i>S. rolf sii</i> gây ra.....	8
Hình 1.4. Nuôi cấy <i>S. rolf sii</i> trên thạch dextrose khoai tây	9
Hình 1.5. Sự phát triển sợi nấm <i>S. rolf sii</i> trên gốc (A) và vỏ quả (B) cây lạc	10
Hình 1.6. Cấu trúc chitin và các kiểu phân cắt của các loại chitinase	18
Hình 2.1. Quả và hạt của giống lạc L14.....	31
Hình 2.2. Cây <i>N. benthamiana</i>	31
Hình 2.3. Vector pMYV719	32
Hình 2.4. Vector pMYV508	32
Hình 2.5. Vector pQE30	33
Hình 2.6. Sơ đồ thí nghiệm tổng quát.....	34
Hình 3.1. Hạt lạc sau 10 ngày gieo theo các phương thức khác nhau.....	49
Hình 3.2. Nuôi cấy <i>in vitro</i> cây lạc	51
Hình 3.3. Tái sinh chồi từ trụ trên lá mầm (A), trụ dưới lá mầm (B) và mắt lá mầm (C) của cây lạc <i>in vitro</i> sau 4 tuần nuôi cấy	52
Hình 3.4. Cắt hạn chế vector pQE30 tái tổ hợp mang các gen chitinase 42 kDa bằng <i>Bam</i> HI và <i>Sac</i> I	55
Hình 3.5. SDS-PAGE của protein hòa tan tổng số từ tế bào <i>E. coli</i> M15 được biến nạp vector pQE30 mang các gen <i>syncodChi42-1</i> (a), <i>syncodChi42-2</i> (b) và <i>Chi42</i> (c)	57
Hình 3.6. SDS-PAGE (a) và Western blot (b) của enzyme Ta-CHI42..	58
Hình 3.7. Hoạt tính thủy phân chitin của enzyme Ta-CHI42 tinh sạch.....	59
Hình 3.8. Đặc điểm của enzyme Ta-CHI42 tinh sạch.....	60
Hình 3.9. Ảnh hưởng của enzyme Ta-CHI42 tinh sạch lên sinh trưởng của <i>A. niger</i>	62
Hình 3.10. Sơ đồ thiết kế vector biểu hiện thực vật nhóm pNHL19.....	64
Hình 3.11. Khuếch đại PCR các gen chitinase 42 kDa từ khuẩn lạc <i>E. coli</i> với các cặp mồi đặc hiệu.....	64
Hình 3.12. Cắt hạn chế vector pNHL19.1 bằng <i>Xba</i> I và <i>Sac</i> I.....	65
Hình 3.13. Cắt hạn chế vector pNHL19.2 bằng <i>Xba</i> I và <i>Sac</i> I.....	65
Hình 3.14. Cắt hạn chế vector pNHL19.3 bằng <i>Xba</i> I và <i>Sac</i> I.....	65
Hình 3.15. Sơ đồ thiết kế nhóm vector biểu hiện thực vật pNHL20.....	66
Hình 3.16. Khuếch đại PCR các gen chitinase từ khuẩn lạc <i>E. coli</i> với các cặp mồi đặc hiệu.....	67
Hình 3.17. Cắt hạn chế các vector pNHL20 bằng <i>Xba</i> I và <i>Sac</i> I.	67
Hình 3.18. Khuếch đại PCR các gen chitinase ở nhóm vector pNHL19 từ <i>A. tumefaciens</i> LBA4404.....	68

Hình 3.19. Khuếch đại PCR các gen chitinase ở nhóm vector pNHL20 từ <i>A. tumefaciens</i> LBA4404.....	69
Hình 3.20. Cắt hạn chế các vector pNHL19 (trái) và vector pNHL20 (phải) bằng <i>Xba</i> I và <i>Sac</i> I	69
Hình 3.21. Điện di SDS-PAGE dịch chiết protein từ lá cây <i>N. benthamiana</i> chuyển gen ..	71
Hình 3.22. Phân tích Western blot dịch chiết protein từ lá cây <i>N. benthamiana</i> chuyển gen	72
Hình 3.23. Cường độ của tín hiệu Western blot. PC: enzyme Ta-CHI42 tinh sạch từ vi khuẩn làm đối chứng dương.....	73
Hình 3.24. Hoạt tính thủy phân colloidal chitin của enzyme Ta-CHI42 từ lá của cây <i>N. benthamiana</i> chuyển gen.....	73
Hình 3.25. Hoạt tính chitinase của enzyme Ta-CHI42 từ cây <i>N. benthamiana</i> chuyển gen chitinase sau 3-7 ngày xâm nhiễm.....	74
Hình 3.26. Thử nghiệm hoạt tính kháng nấm <i>S. rolfisii</i> của enzyme Ta-CHI42 từ cây <i>N. benthamiana</i> mang gen <i>syncodChi42-1</i> và <i>syncodChi42-2</i>	75
Hình 3.27. Ảnh hưởng của các yếu tố đến tỷ lệ lá mầm có phôi tạo chồi và sống sót ở giống lạc L14 qua biến nạp trung gian <i>A. tumefaciens</i>	78
Hình 3.28. Ảnh hưởng của nồng độ cefotaxime (mg/L) đến tỷ lệ mầm tạo chồi, sống sót và sạch khuẩn của cây lạc chuyển gen	80
Hình 3.29. Cây lạc L14 biến nạp vector pNHL19.2	83
Hình 3.30. Cây lạc L14 biến nạp vector pNHL20.3	83
Hình 3.31. Cây lạc L14 biến nạp vector pNHL20.2 vào mắt lá mầm	84
Hình 3.32. Khuếch đại PCR đoạn chỉ thị của các gen mã hóa chitinase 42 kDa ở cây lạc chuyển gen dùng vector pNHL19.....	85
Hình 3.33. Khuếch đại PCR đoạn chỉ thị của các gen mã hóa chitinase kDa ở cây lạc chuyển gen dùng vector pNHL20.....	86
Hình 3.34. Phân tích biểu hiện của Ta-CHI42 ở các cây lạc chuyển gen dùng vector pNHL19.....	87
Hình 3.35. Phân tích biểu hiện của Ta-CHI42 ở các cây lạc chuyển gen dùng vector pNHL20.....	88
Hình 3.36. Hoạt tính thủy phân colloidal chitin của enzyme Ta-CHI42 từ dịch chiết protein của rễ cây lạc chuyển gen dùng vector pNHL19	89
Hình 3.37. Hoạt tính thủy phân colloidal chitin của enzyme Ta-CHI42 từ dịch chiết protein của rễ cây lạc chuyển gen dùng vector pNHL20	89
Hình 3.38. Hoạt tính chitinase của các dòng lạc chuyển gen dùng vector pNHL20.....	90
Hình 3.39. Hoạt tính chitinase của các dòng lạc chuyển gen dùng vector pNHL19.....	90
Hình 3.40. Thử nghiệm hoạt tính kháng nấm <i>in vitro</i> đối với <i>S. rolfisii</i> của rễ cây lạc chuyển gen dùng vector pNHL19	92

Hình 3.41. Thử nghiệm hoạt tính kháng nấm <i>in vitro</i> đối với <i>S. rolfsii</i> của rễ cây lạc chuyển gen dùng vector pNHL20	92
Hình 3.42. Khả năng kháng <i>S. rolfsii</i> của các dòng lạc chuyển gen chitinase trong điều kiện <i>in vivo</i>	93
Hình 3.44. Cây lạc chuyển gen chitinase trồng trong nhà lưới.....	112

DANH MỤC BẢNG

Bảng 2.1. Trình tự nucleotide của các motif đặc hiệu của các gen chitinase	40
Bảng 2.2. Trình tự nucleotide của các motif đặc hiệu cho đoạn chỉ thị của các gen chitinase	42
Bảng 3.1. Ảnh hưởng của điều kiện khử trùng đến khả năng nảy mầm của hạt lạc.	48
Bảng 3.2. Ảnh hưởng của phương thức nảy mầm hạt lạc.	49
Bảng 3.3. Tái sinh chồi từ các loại mẫu nuôi cấy khác nhau trên môi trường MS bổ sung BAP 4 mg/L và NAA 0,1 mg/L	50
Bảng 3.4. Ảnh hưởng của BAP lên tái sinh chồi của trụ trên lá mầm.	52
Bảng 3.5. Tái sinh chồi từ lá mầm trên môi trường MS chứa 4 mg/L BAP.	53
Bảng 3.6. Ảnh hưởng của NAA và IBA đến khả năng tạo rễ của chồi <i>in vitro</i>	54
Bảng 3.7. Ảnh hưởng của enzyme Ta-CHI42 tinh sạch lên sinh khối tươi và khô của sợi nấm <i>A. niger</i> sau 48 giờ nuôi cấy	62
Bảng 3.8. Ảnh hưởng của enzyme Ta-CHI42 từ cây <i>N. benthamiana</i> mang gen <i>syncodChi42-1</i> và <i>syncodChi42-2</i> lên sinh khối tươi và khô của sợi nấm <i>S. rolfii</i> sau 36 giờ nuôi cấy	75
Bảng 3.9. Hiệu quả chuyển gen chitinase vào các loại mẫu khác nhau ở cây lạc.....	82
Bảng 3.10. Khả năng kháng <i>S. rolfii</i> của các dòng lạc chuyển gen chitinase trồng trong điều kiện <i>in vivo</i>	94
Bảng 3.12. Thời gian sinh trưởng và phát triển của các dòng lạc chuyển gen chitinase.....	98
Bảng 3.13. Chiều cao thân chính của các dòng lạc chuyển gen ở các giai đoạn sinh trưởng và phát triển.	100
Bảng 3.14. Số cành cấp 1 và tổng số cành trên cây của các dòng lạc chuyển gen chitinase	101
Bảng 3.15. Số lá trên cây của các dòng lạc chuyển gen chitinase.....	103
Bảng 3.17. Hàm lượng chlorophyll của các dòng lạc chuyển gen chitinase.....	106
Bảng 3.18. Các yếu tố cấu thành năng suất của các dòng lạc chuyển gen chitinase.....	107
Bảng 3.19. Thành phần hóa sinh trong hạt lạc khô của các dòng lạc chuyển gen chitinase	111

MỞ ĐẦU

1. LÝ DO CHỌN ĐỀ TÀI

Lạc (*Arachis hypogaea* L.) là loài cây họ đậu quan trọng được trồng rộng rãi ở vùng nhiệt đới và á nhiệt đới để làm thực phẩm và lấy dầu [133]. Ở Việt Nam, lạc là một trong những cây lấy dầu quan trọng nhất, với tổng diện tích 160 nghìn ha, năng suất 2,5 tấn/ha và sản lượng 400 nghìn tấn vào năm 2021 [276]. Tuy nhiên, cây lạc dễ nhiễm các loại nấm bệnh, đặc biệt là nấm sinh ra trong đất, dẫn đến năng suất thấp và chất lượng hạt giống kém. Trong những năm gần đây, bệnh thối rễ và thối thân do *Sclerotium rolfsii* gây ra đã trở thành mối đe dọa lớn đối với sản xuất lạc, đây là bệnh truyền qua đất có sức tàn phá trên thế giới. *S. rolfsii* chủ yếu gây hại phần gốc thân của cây lạc và làm cho toàn bộ cây bị héo, chết và làm giảm sản lượng lạc từ 10-80% [64], [292]. Một số biện pháp phòng trừ được nghiên cứu áp dụng hiện nay như thuốc hóa học [210], sử dụng các vi sinh vật đối kháng [77], [222], luân canh cây trồng [14]. Trong đó, tạo giống cây trồng mang các gen kháng bệnh được coi là phương thức hiệu quả và kinh tế nhất để kiểm soát bệnh và thân thiện với môi trường.

Chitinase (EC 3.2.1.14) là một họ các enzyme xúc tác quá trình thủy phân các liên kết β -1,4 N-acetyl- β -D-glucosamine của chitin. Chitin là một trong những polysaccharide phổ biến trong tự nhiên [61] và là thành phần chính của khung cấu trúc thành tế bào nấm [150], bộ xương ngoài và niêm mạc ruột của côn trùng và vỏ của các loài giáp xác [260]. Chitinase rất đa dạng về cấu trúc và cơ chế hoạt động, được ứng dụng phổ biến trong kiểm soát sâu bệnh hại cây trồng [205], tổng hợp chitooligosaccharide [294], công nghiệp thực phẩm và dược phẩm, xử lý chất thải chế biến thủy sản và sản xuất nhiên liệu sinh học [222]. Trong sản xuất nông nghiệp, chitinase là một trong những tác nhân sinh học kháng nấm bệnh ở cây trồng hiệu quả nhất [146]. Nhiều loài nấm *Trichoderma* có khả năng tiết chitinase ngoại bào nên chúng thường được sử dụng để kiểm soát các bệnh nấm hại cây trồng [46], [193]. Đến nay, một số gen chitinase của các chủng *Trichoderma* đã được tạo dòng và biểu hiện dị chủng trong một số vật chủ như *Chit46* từ *T. harzianum* trong *Pichia pastoris* [86], *Chit33* và *Chit42* từ *T. harzianum* trong *E. coli* [52], *ech42* từ *T. aureoviride* trong *Saccharomyces cerevisiae* [134]. Và một số gen mã hóa chitinase từ các sinh vật khác, như *chitinase-3* và *Rchit* từ lúa [124], [213] hoặc *chitinase* từ thuốc lá [228] đã được

đưa vào cây lạc để ngăn ngừa nhiễm nấm. Tuy nhiên, chưa nghiên cứu nào biến nạp gen chitinase từ vi sinh vật vào cây lạc, đặc biệt là các loài thuộc chi *Trichoderma*.

Nghiên cứu chuyển gen chitinase của *Trichoderma* vào cây lạc để tăng tính kháng nấm là một giải pháp hiệu quả, thân thiện với môi trường và hiện đang được quan tâm ứng dụng trên nhiều đối tượng cây trồng khác nhau. Trong đó, gen mã hóa chitinase 42 kDa của *T. asperellum* thuộc endochitinase là nhóm enzyme được quan tâm và nghiên cứu chi tiết hơn cả vì tính đa dạng, sự hiện diện thường xuyên khi nuôi cảm ứng với cơ chất chứa chitin và khả năng ứng dụng trong kiểm soát sinh học của nó hơn hẳn các nhóm còn lại trong hệ enzyme thủy phân chitin [116], [159]. Nghiên cứu của Loc và cs (2013) cho thấy gen *Chi42* mã hóa chitinase 42 kDa của *T. asperellum* có hoạt tính mạnh [157] nhưng chưa có công trình nào thực hiện chuyển gen này vào cây lạc để tạo ra dòng lạc có khả năng kháng nấm cao.

Xuất phát từ cơ sở khoa học và thực tiễn trên, chúng tôi đã thực hiện đề tài **“Nghiên cứu khả năng kháng bệnh héo rũ gốc mốc trắng của cây lạc (*Arachis hypogaea* L.) được chuyển gen *Chi42*”**.

2. MỤC TIÊU NGHIÊN CỨU

Biểu hiện thành công gen mã hóa chitinase 42 kDa từ *T. asperellum* SH16 ở giống lạc L14 và tạo được các dòng lạc chuyển gen có khả năng kháng nấm *S. rolfii* mạnh.

3. NỘI DUNG NGHIÊN CỨU

- (1) Hoàn thiện hệ thống tái sinh *in vitro* giống lạc L14
- (2) Sản xuất kháng thể đa dòng kháng chitinase 42 kDa ở chuột để phục vụ phân tích Western blot
- (3) Thiết kế vector biểu hiện ở thực vật mang các gen chitinase 42 kDa
- (4) Biểu hiện tạm thời các gen chitinase 42 kDa trong cây *Nicotiana benthamiana*
- (5) Nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố lên hiệu quả chuyển gen chitinase 42 kDa vào cây lạc qua trung gian *A. tumefaciens*
- (6) Nghiên cứu biến nạp các gen chitinase 42 kDa vào cây lạc thông qua *A. tumefaciens*
- (7) Nghiên cứu một số đặc điểm sinh lý và hóa sinh của các dòng lạc chuyển gen chitinase 42 kDa sinh trưởng trong điều kiện *in vivo*

4. Ý NGHĨA KHOA HỌC VÀ THỰC TIỄN

4.1. Ý nghĩa khoa học

Kết quả nghiên cứu của luận án sẽ cung cấp các dẫn liệu khoa học mới, có tính hệ thống về tối ưu hóa gen chitinase 42 kDa để biểu hiện ở thực vật, vector chuyển gen, chuyển gen chitinase 42 kDa của *T. asperellum* vào cây lạc để tăng khả năng kháng bệnh héo rũ gốc mốc trắng do nấm *S. rolf sii* gây ra, đồng thời tạo ra các dòng lạc chuyển gen có khả năng sinh trưởng và phát triển tốt.

4.2. Ý nghĩa thực tiễn

Kết quả luận án cũng là cơ sở để ứng dụng biện pháp cải thiện khả năng kháng nấm của cây lạc nhằm nâng cao năng suất và hiệu quả sản xuất lạc, góp phần bảo vệ môi trường. Đồng thời, kết quả nghiên cứu của luận án được đăng tải trên các tạp chí khoa học chuyên ngành trong nước và quốc tế là tài liệu tham khảo có giá trị trong giảng dạy và nghiên cứu.

5. NHỮNG ĐÓNG GÓP MỚI CỦA LUẬN ÁN

- Đã hoàn thiện quy trình tái sinh *in vitro* cho giống lạc L14: khử trùng hạt lạc bằng NaOCl 65% trong 10 phút, tái sinh các loại mẫu cây khác nhau của cây lạc và tạo cụm chồi trên môi trường MS có bổ sung 4 mg/L BAP và 0,1 mg/L NAA, tạo rễ trên môi trường MS có bổ sung 0,5 mg/L NAA.

- Đã tối ưu hóa trình tự nucleotide gen *Chi42* hoang dại mã hóa chitinase 42 kDa của *T. asperellum* SH16 cho biểu hiện thực vật. Hai trình tự có bộ ba tối ưu cho biểu hiện ở thực vật đã được đăng ký trên GenBank với các mã số MT083802.1 (*syncodChi42-1*) và MT083803.1 (*syncodChi42-2*). Đã thiết kế thành công các vector biểu hiện thực vật mang lần lượt 3 gen chitinase (*Chi42*, *syncodChi42-1* và *syncodChi42-2*) dưới sự điều khiển biểu hiện của một trong hai loại promoter đặc hiệu rế pAsy hoặc promoter thường trực dp35S.

- Đã biểu hiện và tinh sạch thành công chitinase 42 kDa ở *E. coli*. Đồng thời đã sử dụng enzyme này để sản xuất thành công kháng thể đa dòng kháng chitinase 42 kDa ở chuột phục vụ cho phân tích Western blot.

- Đã tiếp hợp thành công các vector biểu hiện thực vật mang các gen chitinase 42 kDa vào *A. tumefaciens* LBA4404 và đã biểu hiện tạm thời các gen này ở dạng hoạt động mạnh trong cây *N. benthamiana* bằng kỹ thuật thâm nhập.

- Đã biến nạp và tuyển chọn được 16 dòng lạc L14 mang các gen *Chi42*, *syncodChi42-1* và *syncodChi42-2* có mức độ biểu hiện chitinase cao. Sự hiện diện của các gen chitinase đã làm tăng hoạt tính kháng nấm *S. rolf sii* của các dòng lạc chuyển gen trong cả điều kiện *in vitro* và *in vivo*.

CHƯƠNG 1. TỔNG QUAN CÁC VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU

1.1. BỆNH HÉO RŨ GÓC MỐC TRẮNG DO NẤM *Sclerotium rolfii* GÂY RA VÀ BIỆN PHÁP PHÒNG TRỪ

1.1.1. Cây lạc

Lạc (*Arachis hypogaea* L.) là một loại cây trồng có hiệu quả kinh tế cao và có giá trị đa dạng về các mặt dinh dưỡng, chăn nuôi, trồng trọt cũng như trong công nghiệp. Trong hạt lạc có đầy đủ các thành phần như: lipid (40-54%), protein (20-30%), carbohydrate (16-22%), vitamin (A, B, D, E và K), là nguồn bổ sung dinh dưỡng quan trọng cho con người [282]. Protein của hạt lạc có đủ 8 loại amino acid không thay thế. Lạc là loại thực phẩm cung cấp năng lượng cao, 100 g hạt lạc cung cấp 567 cal [189]. Hạt có thể sử dụng trực tiếp hoặc ép dầu thực vật, sữa lạc, bơ lạc, phomat lạc. Ngoài ra, khô dầu lạc, các sản phẩm phụ dầu lạc, cám lạc, thân, lá còn được sử dụng làm thức ăn trong chăn nuôi và làm phân bón cũng rất tốt. Trong công nghiệp, lạc phục vụ cho công nghiệp ép dầu, công nghiệp thực phẩm và trong nhiều ngành công nghiệp khác (chất dẻo, mực in...). Hạt lạc là mặt hàng có giá trị xuất khẩu cao.

Cây lạc được trồng phổ biến ở hơn 100 nước với diện tích khoảng 22 triệu ha, là cây trồng quan trọng đối với các vùng nhiệt đới và cận nhiệt đới ở châu Á, châu Phi, Bắc và Nam Mỹ [243]. Châu Á và châu Mỹ là hai châu lục có khối lượng xuất khẩu lạc lớn nhất (chiếm 78,56% khối lượng lạc xuất khẩu trên thế giới). Năm 2020, sản lượng lạc thế giới ước tính đạt 47 triệu tấn, sản lượng lạc của Việt Nam đạt khoảng 434 ngàn tấn [275]. Sản lượng lạc xuất khẩu của Việt Nam giai đoạn 2019-2020 ước tính đạt khoảng 10 ngàn tấn [275].

Không chỉ mang lại hiệu quả kinh tế cao, trồng lạc còn có tác dụng cải tạo đất, chống xói mòn. Các vi khuẩn *Rhizobium* có khả năng cố định đạm sống cộng sinh trong nốt sần của cây lạc là đặc tính tuyệt vời làm lạc trở thành cây có khả năng bảo vệ, duy trì và cải thiện độ phì nhiêu của đất rất hiệu quả [18]. Theo ước tính, các cây họ Đậu nói chung có thể đưa lại 70 triệu tấn đạm mỗi năm từ nguồn nitrogen không khí [58].

Ở Thừa Thiên Huế, lạc cũng được xem là một trong những cây trồng quan trọng, có hiệu quả kinh tế cao. Trong những năm gần đây, ở một số vùng sản xuất nông

nghiệp của tỉnh, cây lạc chỉ đứng sau lúa và được coi là cây chủ lực có hiệu quả kinh tế cao hơn so với một số cây trồng khác. Các giống lạc được trồng chủ yếu trên địa bàn tỉnh là L14, Dù Tây Nguyên,... có thời gian sinh trưởng 120-135 ngày.

1.1.2. Các bệnh hại do nấm gây ra ở cây lạc

Với tình trạng khí hậu trên trái đất đang biến đổi không ngừng, nhiệt độ trên trái đất đang ngày càng tăng cao, dẫn đến các hiện tượng lũ lụt, hạn hán, dịch bệnh, gây ảnh hưởng không nhỏ đến sự sinh trưởng, phát triển của các loại cây trồng nói chung và cây lạc nói riêng. Hơn 55 mầm bệnh được cho là ảnh hưởng đến sinh trưởng và phát triển của cây lạc [103]. Tất cả các bộ phận của cây lạc đều dễ bị nhiễm bệnh. Các bệnh trên cây lạc có thể xảy ra trong suốt vòng đời của cây. Nhiều loại bệnh có thể làm giảm số lượng hoặc chất lượng của quả và hạt [199]. Thiệt hại hàng năm về năng suất lạc trên thế giới do bệnh gây ra ước chừng 25-80% [70].

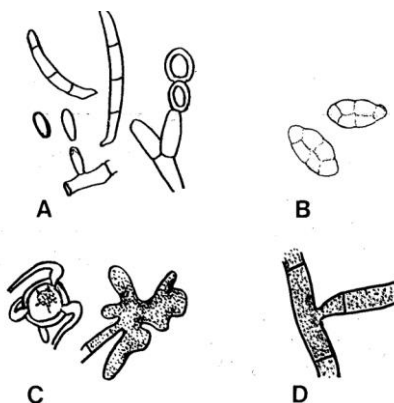
Việt Nam nói chung và Thừa Thiên Huế nói riêng có khí hậu nóng ẩm, là điều kiện thuận lợi cho dịch hại cây trồng phát sinh, phát triển, đặc biệt là các loài nấm bệnh có nguồn gốc từ đất. Trong những năm gần đây, sự gia tăng về diện tích trồng lạc và việc áp dụng các biện pháp thâm canh đã làm phát sinh ngày càng nhiều dịch hại nguy hiểm.

Các bệnh do nấm gây ra ở cây lạc chiếm số lượng lớn và mức độ nghiêm trọng hơn so với các tác nhân gây bệnh khác. Khoảng 50 chi nấm là tác nhân gây bệnh trên cây lạc [143]. Các bệnh nấm gây ra trên cây lạc có thể được phân loại thành các bệnh nấm trên lá; trên hạt và cây con; bệnh ở thân, rễ và vỏ quả [199]. Nhiều chi nấm tạo bào tử vô tính với số lượng lớn trên các bộ phận của cây bị nhiễm bệnh (Hình 1.1A và 1.1B). Những bào tử như vậy thường có thời gian tồn tại ngắn và là nguồn lây nhiễm ban đầu cho cây lạc. Bào tử hữu tính (thường được tạo ra với số lượng thấp hơn, bằng cách hợp nhất hữu tính) có thành dày. Các bào tử hữu tính này chính là nguồn lây nhiễm ban đầu cho cây lạc. Cả hai loại bào tử đều lây lan qua không khí, nước, động vật và các thiết bị. Nấm còn tồn tại bằng cách hình thành các cơ quan nghỉ: bào tử vách dày, hạch nấm, hoặc noãn bào tử (Hình 1.1C). Những mầm sống này có thể tồn tại nhiều năm trong đất [143].

1.1.3. Bệnh héo rũ gốc mốc trắng do nấm *S. rolfsii*

Bệnh héo rũ gốc mốc trắng do nấm *S. rolfsii* được báo cáo đầu tiên từ năm 1892 với phát hiện Rolfs về nấm này liên quan đến bệnh bạc lá cà chua ở Florida [41]. Phạm

vi ký chủ của *S. rolfsii* rộng, sự phát triển mạnh và khả năng tạo ra hạch nấm dai dẳng của loài nấm này đã gây ra nhiều thiệt hại kinh tế đến cây trồng bị nhiễm nấm [74], [246]. Trên cây lạc, bệnh do *S. rolfsii* gây ra thối thân, trắng mốc, hoặc bệnh bạc lá phương Nam nhưng bệnh thối thân là phổ biến nhất. Bệnh gặp ở hầu hết các vùng sản xuất lạc trên thế giới và gây hậu quả nghiêm trọng [57]. Bệnh do *S. rolfsii* làm giảm năng suất từ 30-80% [258]. Sự lây nhiễm bệnh thường xảy ra đối với các bộ phận của cây tiếp xúc trực tiếp với đất. Trên cây lạc, nấm *S. rolfsii* tấn công thân, rễ, lá, chót và vỏ quả. Bệnh ban đầu có các triệu chứng bao gồm các vết bệnh nhỏ, ngâm nước trên thân dưới hoặc gần bề mặt đất, tiếp theo là vàng và héo ở các cành bên, thân chính và cuối cùng là toàn bộ cây (Hình 1.2) [78]. Các dấu hiệu chẩn đoán nhiễm nấm bao gồm các quạt sợi màu trắng đặc trưng và hạch nấm màu nâu kéo dài từ các mô bị nhiễm bệnh (Hình 1.2). Nấm lây nhiễm vào chót và vỏ quả và gây thối (Hình 1.2).

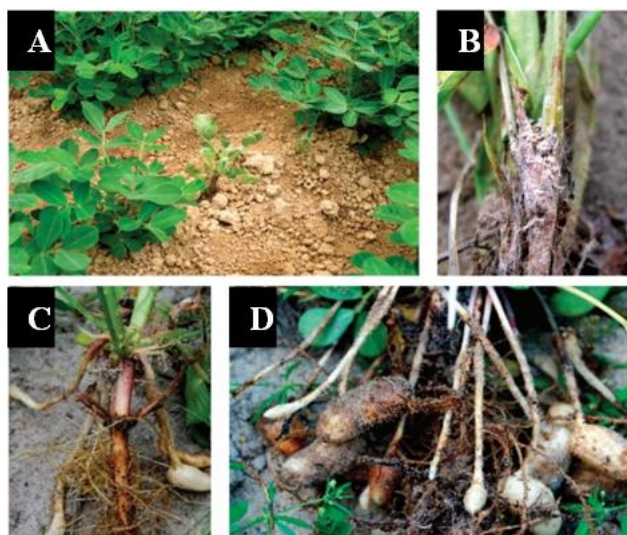


Hình 1.1. Cấu trúc đại diện của 4 loại nấm bệnh hại lạc. A: bào tử nấm *Fusarium* spp; B: bào tử của *Leptosphaerulina crassiasca*; C: xác của *Pythium* spp.; D: sợi nấm của *Rhizoctonia solani*. [143]

Chu kỳ bệnh héo rũ gốc mốc trắng trên lạc được thể hiện trong Hình 1.3 [78]. Hạch nấm tồn tại trong đất và là nguồn lây nhiễm chính. Trong điều kiện thuận lợi, hạch nấm nảy mầm và sợi nấm phát triển tấn công phần dưới của gốc thân. Trên các mô bị bệnh, thảm sợi nấm và hạch nấm được tạo ra và đôi khi cũng tạo ra các bào tử đám (basidiospore). Vai trò của bào tử đám trong chu kỳ bệnh ở đồng ruộng chưa được điều tra chi tiết.

S. rolfsii có phạm vi ký chủ rộng với hơn 500 loài thực vật [41], bao gồm cả cây một lá mầm và hai lá mầm [94]. Cho đến nay, không có công bố nào trên toàn thế giới về các chi ký chủ của *S. rolfsii*, tuy nhiên hơn 270 chi ký chủ đã được báo cáo ở Hoa Kỳ. Chúng bao gồm các loại cây nông nghiệp như khoai lang (*Ipomoea batatas*), bí

ngô (*Cucurbita pepo*), ngô (*Zea mays*), lúa mì (*Triticum vulgare*), lạc (*A. hypogaeae*) và một số cây hoa như thủy tiên (*Narcissus* spp.), iris (*Iris* spp.), lilium (*Lilium* spp.), zinnia (*Zinnia* spp.), và cúc (*Chisy* spp.) [94]. Ở Việt Nam, nhiều loại cây trồng bị nhiễm *S. rolfsii* bao gồm lạc, đậu xanh (*Vigna radiata*), đậu tương (*Glycine max*), cà chua (*Lycopersicon esculentum*), khoai tây (*Solanum tuberosum*), cà tím (*Solanum melongena*), ớt (*Capsicum annuum*), bắp cải (*Brassica oleracea*), dưa chuột (*Cucumis sativus*) và khoai môn (*Colocasia esculenta*) [3], [12]. Các khuẩn lạc của *S. rolfsii* có thể được phân biệt dễ dàng trên mô thực vật bị nhiễm bệnh (Hình 1.3). Nấm phát triển nhanh chóng, sợi nấm trắng mượt có xu hướng tập hợp lại thành các dây dạng thân rễ [41]. Trong điều kiện phòng thí nghiệm, môi trường agar bị bao phủ nhanh chóng bởi sợi nấm (2-3 ngày), bao gồm cả sợi nấm trên không. Nhiệt độ tối ưu cho sự phát triển của sợi nấm và sự hình thành hạch nấm là 27-30°C [215]. Xu và cs (2010) cho thấy sự khác biệt nhiệt độ ở phía Nam và phía Bắc của Hoa Kỳ đã ảnh hưởng đến sự sống còn của hạch nấm. Kết quả là *S. rolfsii* gây hậu quả nghiêm trọng hơn ở khu vực phía Nam so với phía Bắc. Hạch nấm (đường kính 0,3-3,0 mm) bắt đầu phát triển sau 4-7 ngày tăng trưởng khi các sợi nấm tụ lại với nhau thành một khối nhỏ gọn màu trắng [291]. Sau đó, hạch nấm nhanh chóng trở thành màu nâu sẫm [215]. Hạch nấm gồm các sợi nấm đan kết với nhau và đóng vai trò là nguồn lây chính trong chu kỳ bệnh.

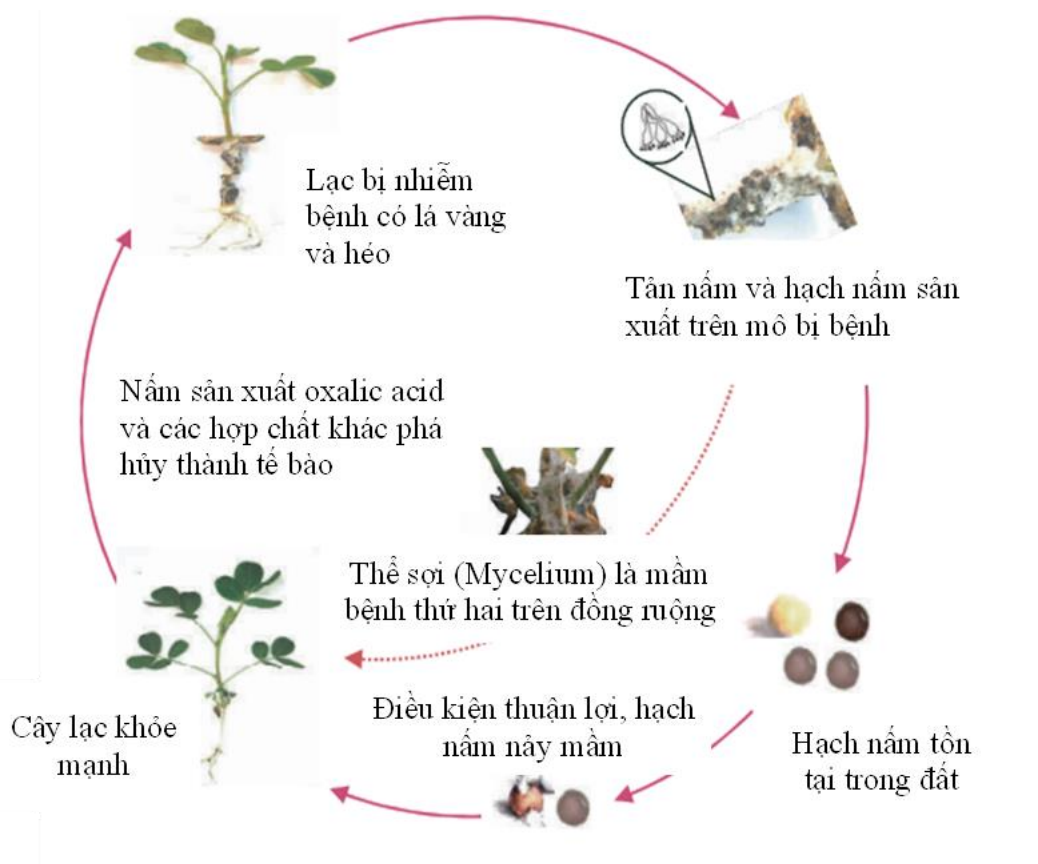


Hình 1.2. Triệu chứng bệnh hại trên cây lạc do *S. rolfsii* gây ra. A: vàng lá và héo úa; B: sợi nấm và hạch nấm trên mô nhiễm; C: triệu chứng thối thân; D: chột và thối vỏ. [78]

1.1.3.1. Triệu chứng bệnh

Cây bệnh héo rũ, xanh hoặc hơi vàng. Cổ rễ và đoạn thân ngầm bị bệnh có vết màu nâu, thối mục, khô xác, nhỏ cây dễ bị nứt gốc, trên gốc thân cây bệnh mọc lớp

nấm trắng đâm tia lan rộng ra mặt đất, hình thành nhiều hạch nấm hình tròn như hạt cải màu trắng, về sau có màu nâu hạt chè [3], [12].



Hình 1.3. Chu kỳ bệnh héo rũ gốc mốc trắng trên lạc do *S. rolfsii* gây ra [78].

1.1.3.2. Đặc điểm vi sinh vật gây bệnh

S. rolfsii không tạo bào tử và là một loài nấm thuộc lớp nấm bất toàn (Deuteromycete), trong bộ nấm tro "Mycelia Sterilia". *S. rolfsii* có phổ kí chủ rộng, kí sinh ở hơn 500 loài thực vật, kí sinh trên cả mô thực vật sống hoặc chết [54].

Loại nấm này có đặc điểm:

Tân nấm: Tân nấm màu trắng xốp, đâm tia phát triển thuận lợi, nhanh trên bề mặt mô bệnh và trên các loại môi trường nhân tạo PGA, PCA, CA. Tân nấm phát triển không làm biến đổi màu môi trường nuôi cấy. Ở nhiệt độ thấp, tân nấm phát triển chậm, thưa hơn, còn ở nhiệt độ thích hợp (25-30°C) tân nấm phát triển nhanh, dày, trắng xốp, sau cấy 3-5 ngày thì hạch nấm được hình thành nhiều (hạch non - hạch già) [3].

Sợi nấm: Sợi nấm đa bào không màu, phân nhánh nhiều. Ở phần vách ngăn của sợi nấm có mấu lồi ôm lấy 2 ngăn của sợi nấm.

Hạch nấm: Các sợi nấm đan kết với nhau, biến thái hình thành hạch nấm. Hạch

nấm ban đầu khi hình thành có màu trắng, về sau chuyển sang màu vàng, màu nâu đen như màu hạt chè khi hạch già. Hạch nấm có dạng hình tròn, nhỏ như hạt cải, kích thước biến động tùy theo các isolate nấm phân lập trên các cây ký chủ (Hình 1.4). Cắt ngang hạch nấm thấy phần bên ngoài hạch các sợi nấm xếp sát nhau tạo thành vỏ, bên trong là các sợi nấm quấn tròn như hạt xốp xếp lại với nhau. Hạch nấm có đường kính từ 0,5-2 mm (Hình 1.4) [215].

Sợi nấm của *S. rolfsii* tồn tại tốt nhất trong đất cát, trong khi hạch nấm tồn tại tốt nhất trong điều kiện ẩm, hiếu khí ở bề mặt đất [215].



Hình 1.4. Nuôi cấy *S. rolfsii* trên thạch dextrose khoai tây. Nấm tạo ra khuẩn lạc hình tròn, sợi nấm có màu trắng, hạch nấm màu nâu [261].

1.1.3.3. Đặc điểm phát sinh và phát triển

Bệnh phát sinh phát triển mạnh trong điều kiện nhiệt độ tương đối cao, ẩm ướt, cây sinh trưởng kém. Trên đất trồng độc canh, đất cát thô, đất có nhiều chất hữu cơ, tàn dư cây chưa hoại mục, vụ xuân, ở giai đoạn ra hoa và quả non bệnh hại nặng hơn. Bệnh xuất hiện trong suốt quá trình sinh trưởng của cây nhưng ở mỗi giai đoạn sinh trưởng mức độ bệnh khác nhau. Nấm *Sclerotium* tiết ra oxalic acid gây hại cây và gây độc cho thực phẩm. Sợi nấm *Sclerotium* trực tiếp xâm nhập qua biểu bì, qua vết thương mà phát triển thành đám sợi trắng ở cổ rễ, gốc thân làm mô bệnh thối mục, cây khô chết (Hình 1.5A). Nấm phá hại tia củ lạc trong đất làm tốp, thối củ, hạt mốc, mất

sức nảy mầm hoặc khi gieo mầm mọc yếu, cây sẽ bị bệnh (Hình 1.5B). Trên đồng ruộng, loại nấm này đều nhờ nước tưới, mưa gió mà truyền lan [70].



Hình 1.5. Sự phát triển sợi nấm *S. rolfii* trên gốc (A) và vỏ quả (B) cây lạc [139].

1.1.4. Cơ chế kháng nấm bệnh của cây lạc

Cơ chế kháng nấm của thực vật

Bệnh do nấm gây ra phá hủy ít nhất 125 triệu tấn/năm các loại cây trồng quan trọng nhất trên thế giới như lúa mì, ngô, đậu nành và khoai tây - năng suất này có thể nuôi sống 600 triệu người. Nấm không chỉ gây hại trên đồng ruộng mà còn gây tổn thất lớn ở khâu sau thu hoạch: trong quá trình bảo quản, vận chuyển sản phẩm hoặc đến tay người tiêu dùng. Ngoài ra, một số loại nấm còn tạo ra độc tố, chất có khả năng gây bệnh và tử vong cho cả người và động vật. Thông thường nông dân sử dụng thuốc diệt nấm để điều trị bệnh nấm và yêu cầu sản phẩm không có dư lượng thuốc trừ sâu, nhưng không phải lúc nào chúng cũng hiệu quả 100%.

Giống như con người, thực vật đã phát triển các chiến lược phòng thủ để bảo vệ mình trước sự tấn công của mầm bệnh. Một nhóm nghiên cứu từ Trung tâm Nghiên cứu Hệ gen Nông nghiệp (CRAG) của Tây Ban Nha đã phát hiện ra rằng, việc điều chỉnh hoạt động của protein trong cây theo cơ chế được gọi là SUMOylation là rất quan trọng để bảo vệ thực vật chống lại sự nhiễm nấm [62].

Cây lạc khi bị nhiễm mầm bệnh vi sinh vật, có khả năng tạo ra các hợp chất có nguồn gốc từ stilbene được coi là phytoalexin kháng nấm. Các hợp chất stilbenoid trong cây lạc có vai trò trong các cơ chế bảo vệ thực vật, chúng có khả năng kháng các loại nấm gây bệnh thực vật thuộc các chi *Colletotrichum*, *Botrytis*, *Fusarium* và *Phomopsis* [250].

Cơ chế kháng nấm S. rolfii của cây lạc

S. rolfii có phạm vi ký chủ rộng rãi, và việc loại bỏ nó khỏi vùng đất bị nhiễm là một thách thức [138]. Việc quản lý bệnh thối thân khá phức tạp, vì nấm hình thành

hạch nấm, có thể tồn tại một thời gian dài trong đất do sự hiện diện của melanin ở màng ngoài [180]. Để quản lý sự lây nhiễm bệnh thối thân, việc phát triển các giống kháng bệnh được coi là một cách tiếp cận kinh tế và thân thiện với môi trường hơn so với việc sử dụng thuốc diệt nấm. Mặc dù không có kiểu gen nào của cây lạc được báo cáo là có khả năng chống nhiễm *S. rolfisii*, nhưng một số kiểu gen có khả năng kháng ngoài đồng ruộng [88], [262].

Bosamia và cs (2020) đã giải trình tự RNA để làm sáng tỏ các cơ chế kháng bệnh thối rễ mốc gốc trắng của cây lạc ở các kiểu gen kháng (NRCG-CS85) và nhạy cảm (TG37A) trong điều kiện kiểm soát và trong quá trình nhiễm bệnh. Trong số khoảng 290 triệu lượt đọc, gần 251 triệu lượt đọc (92,22%) chất lượng cao đã được thu thập và được căn chỉnh cho phù hợp với bộ gen *A. duranensis* và *A. ipaensis* với ánh xạ trung bình lần lượt là 78,91% và 78,61%. Tổng cộng, khoảng 48,6% các gen được điều chỉnh thường, trong khi khoảng 21,8% và 29,6% các gen quy định độc đáo từ bộ gen của *A. duranensis* và *A. ipaensis* đã được xác định. Một số bản sao được chú thích, chẳng hạn như kinase giống thụ thể, các enzyme chuyển hóa jasmonic acid và các yếu tố phiên mã (TF), bao gồm WRKY, protein Zinc và C2-H2 zinC, cho thấy biểu hiện cao hơn ở các kiểu gen kháng thuốc khi bị nhiễm trùng. Nghiên cứu này cho thấy khả năng miễn dịch do PAMP kích hoạt như một cơ chế đề kháng có thể xảy ra, trong khi con đường tín hiệu jasmonic acid được xác định là một cơ chế bảo vệ có thể có ở lạc [54].

Ngoài ra thực vật còn phát triển một phương thức để tồn tại trước sự tấn công của các mầm bệnh tiềm ẩn bằng cách tạo ra các phân tử tín hiệu vi sinh vật. Nandini và cs (2010) đã nghiên cứu các phản ứng bảo vệ thực vật được tạo ra ở bốn giống lạc khác nhau (J-11, GG-20, TG-26 và TPG41) bằng cách sử dụng các thành phần của nấm *S. rolfisii* ở dạng dịch lọc nuôi cấy nấm và thành tế bào sợi nấm. Kết quả cho thấy mức độ phân tử tín hiệu liên quan đến hàm lượng salicylic acid, các enzyme đánh dấu như peroxidase, phenylalanin amoniacylase, β -1,3-glucanase và lignin đã được xác định. Đã có sự gia tăng đáng kể hàm lượng peroxidase, phenylalanin amoniacylase, salicylic acid, β -1,3-glucanase và lignin trong cây được xử lý dịch lọc nuôi cấy nấm và thành tế bào sợi nấm của tất cả các giống lạc khi so sánh với cây đối chứng. Các cây được xử lý dịch lọc nuôi cấy nấm có hoạt động của enzyme cao hơn nhiều so với các cây được xử lý bằng thành tế bào sợi nấm. Sự gia tăng hoạt động gấp nếp của các enzyme và phân tử tín hiệu khác nhau giữa các giống khác nhau. Các kết quả này chỉ ra rằng việc sử dụng các thành phần nấm (dịch lọc nuôi cấy hoặc sợi nấm) đã gây ra tính kháng toàn thân ở bốn giống lạc khác nhau chống lại *S. rolfisii* [188].

1.1.5. Tình hình nghiên cứu các biện pháp phòng trừ bệnh do *S. rolfsii* gây ra ở cây lạc trên thế giới và Việt Nam

S. rolfsii gây ra nhiều bệnh cây trồng trên toàn thế giới, bao gồm cả cây lạc. Để phòng trừ bệnh héo rũ gốc mốc trắng do *S. rolfsii* gây ra rất khó vì nó có phạm vi ký chủ rộng, tốc độ tăng trưởng nhanh và sản xuất số lượng lớn hạch nấm, hạch nấm tồn tại dai dẳng trong đất [180]. Nhiều biện pháp kiểm soát bệnh do nấm này gây ra bao gồm sử dụng các giống cây trồng kháng nấm, hóa học, sinh học và biện pháp canh tác đã được đề xuất và triển khai, các biện pháp này góp phần giảm tỷ lệ bệnh trên đồng ruộng [31], [130], [141].

Biện pháp canh tác

Biện pháp canh tác để kiểm soát *S. rolfsii* sinh ra từ đất là cày sâu, sử dụng năng lượng mặt trời để làm nóng đất, bón phân hóa học và luân canh cây trồng [214]. Tuy nhiên, để kiểm soát *S. rolfsii* trên lạc việc bổ sung các hợp chất ammonium không được khuyến khích vì điều này làm giảm sự phân giải N_2 trong các nốt sần ở rễ.

Luân canh lạc với những loại cây trồng không phải ký chủ không chỉ cải thiện tình trạng dinh dưỡng của đất mà còn giảm mật độ mầm bệnh. Tuy nhiên, đối với *S. rolfsii* chiến lược này không hiệu quả do nó có phạm vi ký chủ rộng. Luân canh lạc với bông hoặc với ngô làm giảm số lượng hạch của nấm *S. rolfsii* tồn tại trong đất với tỷ lệ thấp nhất [286].

Ngoài ra, ở Việt Nam lúa nước được khuyến cáo là cây trồng luân canh với cây lạc để giảm bệnh héo rũ gốc mốc trắng [16].

Giống cây kháng bệnh

Vì không dễ để lai tạo ra những giống cây trồng có khả năng kháng bệnh cao với *S. rolfsii*. Vì vậy, giống cây trồng có thể được sử dụng như một thành phần của nỗ lực kiểm soát dịch bệnh tổng hợp [25]. Giữa những năm 90, 2 giống cây trồng Toalson và Southern Runner có khả năng kháng một phần với *S. rolfsii* [57] và gần đây một số giống lạc kháng bệnh héo rũ gốc mốc trắng đã được đưa vào thử nghiệm bao gồm Georgia-03L [56], Georgia-07W [57] và Florida-07 [106]. Việc sử dụng các giống cây trồng này vẫn còn hạn chế do mức độ kháng bệnh tương đối thấp.

Jogi và cs (2016) đã xác định các gen biểu hiện khác nhau với mức độ kháng bệnh ngày càng tăng trong tương tác giữa bệnh héo rũ gốc mốc trắng do *S. rolfsii* gây ra và cây lạc.

Nghiên cứu này đã xác định một tập hợp các gen có thể liên quan đến phản ứng của mầm bệnh, dựa vào đó để lựa chọn việc kiểm soát bệnh héo rũ gốc mốc trắng bằng cách tạo cây chuyên gen [135].

Thuốc hóa học

Trong nhiều trường hợp, thuốc diệt nấm như tebuconazole, pentachloronitrobenzene (PCNB) và flutolanil được sử dụng để phòng trừ *S. rolfsii*. Cillers và cs (2003) đã nghiên cứu sử dụng difenoconazole là một thuốc diệt nấm được kết hợp với *T. harzianum*, một loài nấm đối kháng sinh học của *S. rolfsii* trên carbendazim và flusilazole, và chlorothalonil. Difenoconazole làm giảm đáng kể tốc độ phát triển của *S. rolfsii* [74]. Việc trồng lạc trên những ruộng bị nhiễm bệnh được cày sâu sẽ làm giảm đáng kể sự lây nhiễm *S. rolfsii* trên lạc và cũng cải thiện chất lượng của lạc, tuy nhiên không làm tăng sản lượng lạc. Mặc dù thuốc diệt nấm có thể bảo vệ cây lạc khỏi bị nhiễm *S. rolfsii*, tuy nhiên việc sử dụng thuốc hóa học không được khuyến khích vì những tác hại tiềm ẩn của nó đối với môi trường. Vì thế, tích hợp một số biện pháp phòng trừ khác nhau được đề xuất để cung cấp hiệu quả phòng trừ *S. rolfsii* và các bệnh khác trên cây lạc một cách bền vững [74].

Ở Việt Nam, kết quả nghiên cứu của Lê Như Cương và cs (2018) cho thấy, nano bạc hạn chế nấm *S. rolfsii* cả trên môi trường đặc PDA và môi trường lỏng PDB. Tuy nhiên, trong môi trường lỏng, nano bạc thể hiện khả năng kháng nấm cao hơn trên môi trường đặc. Trong điều kiện nhà lưới, nano bạc hạn chế tỷ lệ bệnh, chỉ số bệnh và tỷ lệ cây chết đối với bệnh héo rũ gốc mốc trắng trên cây lạc [1].

Kiểm soát sinh học

Hiện nay, kiểm soát sinh học được coi là một biện pháp thay thế hoặc bổ sung cho các biện pháp quản lý dịch bệnh do *S. rolfsii* gây ra [79].

Ứng dụng của vi sinh vật có ích vào đất, hạt giống hoặc vật liệu trồng trọt đã được đề xuất như một cách tiếp cận bền vững để kiểm soát bệnh thực vật. Các vi sinh vật được nghiên cứu rộng rãi nhất có hoạt động đối kháng với mầm bệnh thực vật và có lợi đối với sự phát triển của cây trồng thuộc chi *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* hoặc chi nấm *Trichoderma* [79], [159].

Các tác nhân kiểm soát sinh học của nấm có thể trực tiếp hoặc gián tiếp tiêu diệt hạch nấm hoặc sợi nấm của *S. rolfsii*. Lectin do *S. rolfsii* sản xuất được đề xuất dùng làm yếu tố nhận biết tác nhân kiểm soát sinh học nấm [214]. Trong số các tác nhân kiểm soát sinh học nấm, các loài *Trichoderma* được nghiên cứu rộng rãi nhất. Khi tương tác với *S. rolfsii*, sợi nấm của *Trichoderma* xâm nhập vào vỏ của hạch nấm và

làm đông cứng mô tủy. Hạch nấm thoái hóa trở nên tối, mềm và tan rã dưới áp lực nhẹ và nghiên cứu đã chỉ ra rằng chitinase và β -1,3-glucanase đóng vai trò quan trọng trong sự tương tác giữa *T. harzianum* và *S. rolfsii* [214]. Bên cạnh *Trichoderma*, một số chi nấm khác đã được thử nghiệm về khả năng phòng trừ bệnh do *S. rolfsii* gây ra trên đậu, cà rốt, ớt, gừng, lúa mì, đậu lăng, vừng, đậu tương, củ cải đường, hướng dương, cà chua hoặc lạc. Các loại nấm đối kháng này bao gồm *Gliocladium virens*, *G. roseum*, *Glomus fascicatum*, *Penicillium pinophilum*, *Gigaspora margarita* và *S. rolfsii* [214].

Để kiểm soát sinh học *S. rolfsii*, một số loài và chi vi khuẩn đã được nghiên cứu. Phần lớn trong số chúng thuộc các loài *Pseudomonas* và *Bacillus*. Các chủng *Pseudomonas* có thể hạn chế sự phát triển của sợi nấm trong ống nghiệm hoặc giảm sự nảy mầm của hạch nấm *S. rolfsii* [267]. Mặc dù *Pseudomonas* nổi tiếng với việc sản xuất đa dạng các hợp chất kháng khuẩn, bao gồm 2,4-diacetylphloroglucinol, pyrrolnitrin, pyoluteorin, rhizoxin, phenazines và lipopeptide [80], [219] hoặc các hợp chất có hoạt tính sinh học khác trong việc kiểm soát sinh học *S. rolfsii* nhưng chưa được nghiên cứu chi tiết. Bên cạnh *Pseudomonas*, một số loài *Bacillus* đã được nghiên cứu về hiệu quả của chúng để kiểm soát bệnh thối thân trên cây lạc. Việc xử lý hạt lạc bằng *Bacillus subtilis* trước khi gieo giúp bảo vệ hạt lạc chống lại *S. rolfsii* và tăng đáng kể số lượng quả [24]. Ngoài ra, đối với các chủng *Bacillus* và các chi vi khuẩn khác được nghiên cứu cho đến nay có rất ít hoặc không có nghiên cứu về các cơ chế cơ bản liên quan đến hoạt động của chúng kháng lại *S. rolfsii*. Hơn nữa, hầu hết các nghiên cứu được thực hiện trong các điều kiện phòng thí nghiệm và chỉ có một số nghiên cứu được thực hiện ở thực địa đồng ruộng [78].

Ngoài ra, một số nghiên cứu còn sử dụng tinh dầu để phòng trừ bệnh do *S. rolfsii* gây ra. Guerra và cs (2015) đã nghiên cứu sử dụng tinh dầu của *Cymbopogon martinii* để kiểm soát cây lạc chống lại bệnh héo rũ gốc mốc trắng do *S. rolfsii* gây ra. Các thử nghiệm được thực hiện ở cả điều kiện *in vitro* và *in vivo*. Tinh dầu *Cymbopogon martinii* ở nồng độ 300 ppm ức chế 55% sự phát triển sợi nấm của *S. rolfsii* và cả số hạch nấm. Nồng độ *C. martinii* ở 400 ppm làm giảm 55% tỷ lệ bệnh. Các chỉ tiêu sinh trưởng của lạc như số quả/cây, khối lượng quả và năng suất tăng lần lượt là 57%, 54% và 40% trong tất cả các công thức xử lý tinh dầu *C. martinii*. Những kết quả này chứng minh rằng dầu *C. martinii* ở nồng độ thấp có thể phòng trừ nấm gây bệnh héo rũ gốc mốc trắng [112].

Ở Việt Nam, các nghiên cứu về biện pháp phòng trừ bệnh do *S. rolfsii* gây ra ở cây lạc cũng đã được chú trọng nghiên cứu. Đỗ Tấn Dũng (2006) đã khảo sát hiệu lực của nấm *T. viride* với các isolate nấm *S. rolfsii* trên môi trường nhân tạo cho thấy khi nấm *T. viride* có mặt trước nấm gây bệnh thì bản thân nó có khả năng chiếm chỗ, cạnh tranh, ức chế và tiêu diệt nấm *S. rolfsii*. Khi xử lý hạt bằng nấm *T. viride* trước thì hiệu quả phòng trừ bệnh héo rũ gốc mốc trắng hại lạc lên đến 85,5%. Còn khi nấm đối kháng có mặt cùng hoặc sau nấm gây bệnh thì khả năng phòng trừ bệnh thấp hơn [3].

Lê Như Cương (2011) đã nghiên cứu khả năng kiểm soát bệnh héo rũ gốc mốc trắng và các bệnh khác trên cây lạc trồng ở Thừa Thiên Huế của các chủng *Pseudomonas* và *Bacillus* cho thấy *Pseudomonas* sp. chủng SH-C52 và R4D2 giảm đáng kể bệnh héo rũ gốc mốc trắng hại lạc ở mức độ tương đương với thuốc trừ nấmazole Folicur. Cả hai chủng vi khuẩn không có hiệu quả chống lại bệnh do *Rhizoctonia* gây ra, bệnh thối cổ đen do *Aspergillus niger* và bệnh đốm lá sớm và muộn do *Cercospora arachidicola* và *Cercosporidium personatum* gây ra. Tuy nhiên, cả hai chủng đều cải thiện năng suất quả lên đến 14% so với loại không được xử lý. Ngoài ra, chủng *Pseudomonas fluorescens* SS101 và *Bacillus* sp. chủng S18F11 và S20D12 đã làm gia tăng đáng kể năng suất quả (lên đến 30%). Tuy nhiên, ba chủng vi khuẩn này không thể kiểm soát được bệnh thối thân, thối rễ, thối đen cổ rễ và bệnh héo xanh nhưng giảm rõ rệt bệnh đốm lá sớm và muộn [2].

Trần Văn Tý (2018) đã nghiên cứu ảnh hưởng của chế phẩm *Trichoderma-Pseudomonas* đến sinh trưởng phát triển và bệnh héo rũ hại lạc ở Quảng Bình. Kết quả nghiên cứu cho thấy chế phẩm sinh học *Trichoderma - Pseudomonas* có khả năng ức chế khá tốt đối với nấm gây bệnh héo rũ gốc mốc trắng (*S. rolfsii*) trên đồng ruộng, hiệu lực ức chế đạt 80% [7].

Nguyễn Thị Mộng Điệp (2018) đã thử tính đối kháng của nấm đối kháng *Trichoderma* trong phòng trừ sinh học nấm *S. rolfsii*. Kết quả khảo nghiệm cho thấy thời gian hình thành hạch nấm khi có mặt của nấm *Trichoderma* kéo dài hơn từ 5-6 ngày so với đối chứng (4 ngày). Bốn chủng nấm *Trichoderma* có khả năng ức chế giảm số lượng hạch nấm hình thành 0,00-4,51 hạch nấm/cm² tản nấm so với đối chứng (9,11 hạch nấm/cm² tản nấm). Trong đó, đáng chú ý chủng *Tri 2* có khả năng ức chế hoàn toàn sự hình thành hạch nấm *S. rolfsii*, làm cho hạch nấm không hình thành được [4].

1.2. ENZYME CHITINASE

1.2.1. Sự phân bố chitinase trong tự nhiên

Chitinase (EC 2.1.4.14) là enzyme thủy phân xúc tác cho quá trình phân hủy các liên kết β -1,4-glycoside giữa các đơn vị N-acetyl-D-glucosamine (GlcNAc) của chitin, đây là một loại polysaccharide cấu trúc có trong động vật chân đốt, vỏ giáp xác và thành tế bào của nấm. Chitinase có trong nhiều loài sinh vật, từ những loài có thành phần cấu trúc chitin như nấm, côn trùng, giáp xác, đến những loài không có chitin như vi khuẩn, thực vật [90]. Chitinase là một glycosyl hydrolase có MW dao động từ 20 kDa đến khoảng 90 kDa. Chitinase của vi khuẩn có phạm vi MW từ 20-60 kDa, tương tự như chitinase thực vật (25-40 kDa) và nhỏ hơn chitinase côn trùng (40-85 kDa). Chitinase hoạt động trên phạm vi nhiệt độ và pH khá rộng, tùy thuộc vào nguồn phân lập. Điều này chứng tỏ chitinase có thể sử dụng rộng rãi cho nhiều ứng dụng trong các điều kiện khác nhau [50]. Cơ chất thủy phân của chitinase là chitin. Tuy nhiên, một số chitinase cũng có thể thủy phân các polymer tương tự [68]. Vi sinh vật được xem là nguồn cung cấp chitinase nhiều hơn so với động vật và thực vật. Nấm mốc là một trong những nhóm vi sinh vật có khả năng sinh tổng hợp chitinase mạnh nhất. Các loài nấm mốc thuộc các chi như *Aspergillus* [115], *Lecanicillium* [226], *Trichoderma* [238] đã được nghiên cứu có khả năng sinh tổng hợp chitinase mạnh. Chitinase từ nấm mốc đóng vai trò quan trọng về mặt dinh dưỡng, sinh trưởng, phát triển và đặc biệt là trong sự phát sinh hình thái bởi vì chitin là thành phần chính của thành tế bào nấm mốc. Chitinase còn giữ vai trò chính trong hoạt động ký sinh nấm nhằm đối kháng lại các loài nấm gây bệnh thực vật. Vì vậy, việc nghiên cứu chitinase nấm mốc rất được quan tâm và đã có một số công trình đã được công bố như: nghiên cứu chitinase và β -glucanase từ nấm *Trichoderma* sp. và khả năng kiểm soát bệnh học đối với một số nấm gây bệnh ở thực vật; khảo sát hoạt tính các hệ enzyme thủy phân chiết tách từ môi trường nuôi cấy *Trichoderma* sp. và thử nghiệm ứng dụng chế biến phân hữu cơ vi sinh [2].

Bên cạnh đó, vi khuẩn cũng được xem là đối tượng có khả năng sinh chitinase khá phong phú. Chitinase được sinh ra từ vi khuẩn thuộc các chi như *Bacillus* [33], *Clostridium* [177], *Streptomyces* [174]. Vi khuẩn tổng hợp chitinase để phân giải các đại phân tử chứa GlcNAc, nguồn cung cấp carbon và nitrogen cho tế bào. Hoạt động chitinase đóng một vai trò quan trọng trong hệ sinh thái của nhiều vi khuẩn biển [50].

Ở thực vật, chitinase có mặt trong thân, hạt, hoa, và củ. Chitinase trong cây được sinh ra khi có sự kích thích của mầm bệnh giúp cây chống lại sự tấn công của các nấm

kí sinh và vi khuẩn gây bệnh. Chitinase còn liên quan đến cả stress sinh học và phi sinh học cũng như quá trình sinh trưởng và phát triển của cây [108]. Một số nghiên cứu cho thấy chitinase tách chiết từ cây cần tây có khả năng ức chế sợi nấm phát triển, các thực vật bậc cao cũng có khả năng tạo chitinase như cao su, thuốc lá,...[245]. Chitinase còn liên quan đến sự phát triển và thoái hóa của lớp biểu bì cũ trong quá trình biến thái hay lột xác [152].

1.2.2. Phân loại chitinase

Chitinase là một phức hệ gồm nhiều loại enzyme. Tùy theo quan điểm của từng tác giả, chitinase được chia làm các nhóm khác nhau. Dựa vào vị trí phân cắt, chitinase được chia thành 2 dạng endochitinase (β -N-acetyl glucosaminidase; EC 3.2.1.14) và exochitinase (β -N-acetyl hexosaminidases; EC 3.2.1.52) [232]. Trong exochitinase gồm 2 dạng là chitobiosidase (EC.3.2.1.29) và N-acetyl glucosaminidase (EC.3.2.1.30). Endochitinase thủy phân điểm cắt bên trong của phân tử chitin và chitodextrin tạo ra các phân tử có khối lượng thấp như chitotriose, chitotetraose và diacetyl chitobiose. Chitobiosidase xúc tác quá trình phân cắt các vi sợi chitin ở đầu không khử giải phóng ra các diacetyl chitobiose (Hình 1.6) [81]. Ở nấm *Trichoderma*, endochitinase là nhóm enzyme được quan tâm và nghiên cứu chi tiết hơn cả vì tính đa dạng, sự hiện diện thường xuyên khi nuôi cảm ứng với cơ chất chứa chitin và khả năng ứng dụng trong kiểm soát sinh học của nó hơn hẳn các nhóm còn lại trong hệ enzyme thủy phân chitin [116].

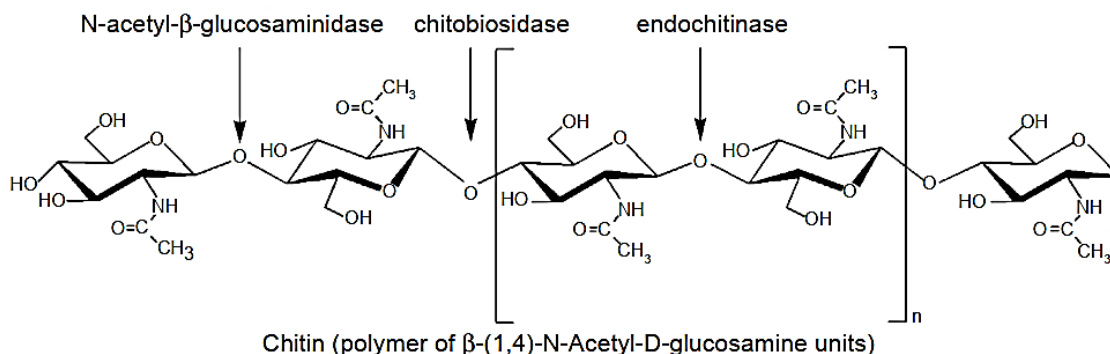
Chitinase cũng được phân loại dựa trên trình tự amino acid, vì điều này giúp hiểu rõ hơn mối quan hệ tiến hóa của các enzyme này với nhau [206]. Do đó, các chitinase được phân thành ba họ: 18, 19 và 20 [119]. Cả hai họ 18 và 19 đều bao gồm endochitinase từ nhiều loại sinh vật khác nhau, bao gồm virus, vi khuẩn, nấm, côn trùng và thực vật. Tuy nhiên, họ 19 chủ yếu bao gồm các chitinase thực vật. Họ 20 bao gồm N-acetylglucosaminidase và một loại enzyme tương tự, N-cetylhexosaminidase [206].

Khi trình tự gen của các chitinase đã được biết đến, chúng còn được phân loại thêm thành sáu lớp dựa trên trình tự của chúng. Đặc điểm xác định các lớp của chitinase là trình tự đầu N, vị trí của enzyme, pH đẳng điện, peptide tín hiệu và vùng cảm ứng [206].

1.2.3. Cơ chế phản ứng của chitinase

Chitinase xúc tác phản ứng biến đổi chitin theo 2 hướng: hướng thứ nhất là cơ chế chuyển dịch với sự tham gia của nhóm lân cận; nhóm cacboxyl bề mặt hoạt động như một tác nhân có ái lực với điện tích dương, dưới sự hỗ trợ từ Asp hoạt động để loại bỏ proton H^+ ra khỏi nhóm N-acetamido trong sự cố định của ion oxazolinium. Hướng thứ hai là cơ chế hoạt động xúc tác các phân còn lại để hỗ trợ cho sự thủy phân các đơn phân.

Theo Okay và cs (2013), chitinase B từ vi khuẩn *Serratia marcescens* là một loại exochitinase, chitinase này thủy phân chitin với sự tham gia của các nhóm ái lực trong trung tâm hoạt động của enzyme. Vị trí liên kết của chitinase thuộc họ glycosyl hydrolase 18 với cơ chất có chứa 3 amino acid là Asp-140, Asp-142 và Glu-144. Sự luân chuyển Asp-142 trên cơ chất có vai trò giúp ổn định điện tích dương của các ion trung gian oxazolinium và là chất cho proton, dẫn tới làm giảm giá trị pKa của Glu-144. Glu-144 đóng vai trò là chất nhận proton, tham gia hình thành liên kết với cơ chất và giải phóng phân tử nước. Khi ở trạng thái nghỉ Asp-142 nằm quá xa so với Glu-144 [194].



Hình 1.6. Cấu trúc chitin và các kiểu phân cắt của các loại chitinase [137].

Khi có sự liên kết của trung tâm hoạt động với cơ chất N-acetyl glucosamine gây ra sự biến dạng của vòng pyranose làm luân chuyển Asp-142 về phía Glu-144, liên kết hydro hình giữa các nhóm amin của Asp-142 và Glu-144 được hình thành. Sự thủy phân các ion trung gian oxazolinium để giải phóng các proton đến Glu-144 và luân chuyển proton của Asp-142 nơi chia sẻ với Asp-140. Sau khi sự liên kết giữa cơ chất và trung tâm hoạt động diễn ra, phân tử nước được giải phóng có vai trò thủy phân các liên kết glycoside bởi amino acid Tyr-214. Cơ chế thủy phân theo hướng 2 được giải thích bởi chitinase A từ vi khuẩn *Bacillus circulans*. Sự liên kết của chitinase A trên bề

mặt phân tử chitin thông qua tương tác của nhóm ái lực gồm 3 amino acid là Trp-69, Trp-33, Trp-245 và 1 phân tử N-acetyl glucosamine trên bề mặt chuỗi đơn của chitin tại miền N-terminal. Chuỗi chitin tương tác với nhóm ái lực của 3 amino acid được đưa vào bên trong của khe xúc tác từ các điểm cuối của chuỗi thông qua sự tương tác với Phe-232. Sự tương tác với các điểm ái lực càng nhiều dẫn đến sự liên kết càng chặt của chuỗi chitin với miền xúc tác thủy phân của enzyme. Kết quả, các sản phẩm được giải phóng trong quá trình thủy phân các chuỗi đơn trong tinh thể chitin là các nối đôi của N-acetyl glucosamine [206].

1.2.4. Tình hình nghiên cứu chitinase từ *Trichoderma*

1.2.4.1. Trên thế giới

Chi *Trichoderma* (Hyphomycetes) phân bố rộng rãi trong tự nhiên, đặc biệt là trong đất [117] và endophyte [43]. Chúng đã được sử dụng trong sản xuất enzyme và kiểm soát sinh học đối với bệnh thực vật [263]. Các loài *Trichoderma* bài tiết các enzyme như chitinase, β -glucanase và protease; các enzyme này được tạo ra trong quá trình tương tác giữa *Trichoderma* và thành tế bào của nấm ký sinh [44], [285]. Các nghiên cứu về đặc tính và hoạt tính của chitinase ngoại bào từ các loài *Trichoderma* đã được bắt đầu từ lâu.

Ulhoa và Peberdy (1991) đã phân lập và sàng lọc 14 dòng của chi *T. harzianum* để xác định khả năng thu nhận chitinase hiệu quả nhất. Chúng tốt nhất cho chitinase là *T. harzianum* 39.1 và chủng này được chọn để nghiên cứu cơ chế tổng hợp enzyme. Sợi nấm của *T. harzianum* 39.1 được rửa sạch và ủ với một loạt các nguồn carbon. Sự tổng hợp chitinase được gây ra trên môi trường chứa chitin, nhưng bị kìm hãm bởi glucose và N-acetylglucosamin. Hoạt độ enzyme chitinase tối ưu ở nồng độ chitin 0-5%, ở 28°C, pH 6 và không phụ thuộc vào tuổi của sợi nấm. Quá trình tổng hợp chitinase bị ức chế bởi cả 8-hydroxyquinoline và cycloheximide, những chất ức chế tổng hợp RNA và protein [273].

Baek và cs (1999) đã nghiên cứu vai trò của chitinase ngoại bào từ *T. virens* Gv29-8 trong việc giảm hoạt tính gây bệnh của *R. solani* [42]. El-Katatny và cs (2001) đã phân lập 24 chủng nấm *Trichoderma*, trong đó *T. harzianum* Rifai (T24) có tiềm năng kiểm soát bệnh do nấm *S. rolfisii* gây ra. Khi chủng T24 được nuôi cấy trên các nguồn carbon khác nhau, sự ức chế sinh trưởng của *S. rolfisii* bởi dịch lọc nuôi cấy T24 tương quan với hoạt động của chitinase ngoại bào và β -1,3-glucanase. Chitinase 43 kDa và 74 kDa β -1,3-glucanase được tinh chế từ dịch lọc nuôi cấy T24, sử dụng kết tủa ammonium sulphate, sau đó sắc ký tương tác kỵ nước (phenyl-Sepharose) và lọc

gel (β -1,3-glucanase). Chitinase cho thấy hoạt tính trên chitin cao hơn so với các cơ chất tương tự ít bị acetyl hóa hơn (chitosan), trong khi β -1,3-glucanase đặc trưng cho các liên kết β -1,3 trong polysaccharide. Cả hai enzyme đều ổn định ở 30°C, trong khi ở 60°C thì chitinase và β -1,3-glucanase bị bất hoạt nhanh chóng, cho thấy thời gian phân giải tương ứng là 15 và 20 phút. Chitinase ức chế sự phát triển của *S. rolfsii* ở giá trị ED50 (effective dose - liều hiệu quả 50%) với liều lượng 2,7 μ g/mL [93].

Sandhya và cs (2004) đã nghiên cứu sản xuất chitinase ngoại bào từ nấm *T. harzianum* TUBF 966 sử dụng quá trình lên men chìm. Chitin dạng keo (1,5% w/v) được sử dụng làm nguồn carbon duy nhất. Chitinase ngoại bào đạt hoạt độ cực đại khoảng 14,7 U/mL sau 96 giờ lên men ở 30°C. Trong khi sử dụng chitin dạng keo 1,5% (w/v) làm nguồn carbon và peptone (0,42% w/v) làm nguồn nitrogen (pH 5,5) cần khoảng 72 giờ để thu được chitinase ngoại bào cực đại. Kết quả cho thấy việc bổ sung các nguồn carbon (0,75% w/v) không tăng tổng hợp chitinase ngoại bào trong khi việc bổ sung các nguồn nitơ (0,42% w/v) như peptone và tryptone trong môi trường lên men cho thấy sự gia tăng đáng kể chitinase ngoại bào [231].

Năm 2009, Alias và cs đã nghiên cứu đặc tính của endochitinase tách từ *T. virens* UKM-1 và biểu hiện thành công trong *E. coli*. Kết quả nghiên cứu cho thấy, endochitinase hoạt động trong khoảng pH 3-7 với pH tối ưu là 6; độ bền nhiệt rộng 30-60°C với nhiệt độ tối ưu là 50°C và sự có mặt của các ion Mg^{2+} hoặc Ca^{2+} đã tăng 20% hoạt tính của enzyme [32]. Tuy nhiên, các nghiên cứu về *T. asperellum* chỉ mới bắt đầu gần đây và chỉ tập trung vào các gen mã hóa chitinase, đặc điểm và hoạt động của nó thể hiện qua các nghiên cứu sau đây:

Loc và cs (2011) cho thấy gen *Chi42* mã hóa chitinase 42 kDa từ *T. asperellum* có hoạt tính mạnh [158], gen này sau đó đã được Loc và cs (2013) tạo dòng và biểu hiện trong nấm men *S. cerevisiae* [157].

Kumar và cs (2012) đã tối ưu hóa các điều kiện sinh trưởng để sản xuất chitinase bằng *T. asperellum* UTP-16 trong quá trình lên men ở trạng thái rắn bằng cách sử dụng bề mặt phản ứng dựa trên thiết kế hỗn hợp trung tâm. Việc sản xuất chitinase ngoại bào được tối ưu hóa, sử dụng phương pháp tiếp cận một yếu tố tại một thời điểm, với 6 biến độc lập (nhiệt độ, pH, NaCl, thời gian ủ, nguồn nitrogen và carbon) và đã thu được 3,31 U/g cơ chất khô. Ngoài ra, chitinase ngoại bào cho hiệu quả kháng nấm *Fusarium* spp. và ức chế sự phát triển của sợi nấm lên đến 3,5-6,5 mm trong thử nghiệm khuếch tán trên thạch [147].

Nadarajah và cs (2014) cũng đã phân lập và xác định đặc điểm gen endochitinase từ dòng *Trichoderma* sp. được phân lập từ các mẫu đất của Malaysia. Kết quả nghiên cứu

cho thấy, trong 6 dòng *Trichoderma* có tính đối kháng cao được sàng lọc về hoạt tính chitinase thông qua phương pháp đĩa kép và các nghiên cứu trong nhà kính. Bằng cách quan sát sự phân hủy của cơ chất chitin, *Trichoderma* T2 được chọn để phân lập gen endochitinase do hoạt tính phân giải chitin cao. DNA bộ gen của *Trichoderma* T2 được tách chiết, khuếch đại và giải trình tự. Trình tự protein ChitT2 có 352 amino acid và tương đồng 99% với endochitinase Chit36Y của *T. harzianum*. Phân tích parsimony cho thấy protein ChitT2 được xếp vào nhóm V với các loại nấm khác và phân tích *in silico* của ChitT2 cho thấy sự tham gia của gen/protein này vào quá trình dị hóa chitin [187].

Năm 2015, Asad và cs đã khảo sát hoạt tính của enzyme ly giải tế bào ở 3 chủng *Trichoderma* được phân lập từ đất nông nghiệp của Pakistan là *T. asperellum*, *T. harzianum* và *Trichoderma* sp. Các chủng *Trichoderma* bản địa và một chủng *R. solani* độc lực được phân lập từ các cây đậu bị nhiễm bệnh cũng được đưa vào nghiên cứu. Hoạt tính của enzyme được xác định bằng cách đo lượng đường khử bằng phương pháp DNS sử dụng các cơ chất thích hợp. Các chất đối kháng được nuôi cấy trong môi trường muối tối thiểu với các thay đổi sau: môi trường A (1 g glucose), môi trường B (0,5 g glucose + 0,5 g *R. solani* đã khử hoạt tính sợi nấm), môi trường C (1 g sợi nấm đối kháng tương ứng đã khử hoạt tính) và môi trường D (1 g sợi nấm *R. solani* đã khử hoạt tính). *T. asperellum* cho thấy sự hiện diện của chitinase, β -1,3-glucanase và xylanase cao hơn trong dịch chiết protein ngoại bào từ môi trường D so với môi trường A. Trong khi đó, hoạt tính của glucosidase và endoglucanase của *T. harzianum* cao hơn ở dịch chiết môi trường D và hoạt tính của β -glucosidase thấp hơn so với các enzyme khác. *T. asperellum* thể hiện sự ức chế tối đa (97,7%). Mặt khác, *Trichoderma* sp. không cho thấy bất kỳ ảnh hưởng nào đến sự phát triển sợi nấm của *R. solani* trên chiết xuất thô [37].

Wu và cs (2017) đã nghiên cứu trên các sợi nấm của *T. asperellum* GDFS1009 và cho rằng *T. asperellum* GDFS1009 có tốc độ sinh trưởng cao, khả năng tạo bào tử cao và ức chế mạnh đối với các mầm bệnh gây héo rũ dưa chuột và thối thân ngô. *T. asperellum* GDFS1009 tiết ra chitinase, glucanase và protease có thể làm phân hủy thành tế bào của nấm và góp phần gây ra bệnh viêm cơ. Các xylanase được tiết ra tạo ra sức đề kháng của cây trồng và tăng cường khả năng miễn dịch của cây chống lại các mầm bệnh. Ngoài ra, kết quả nghiên cứu đã tìm thấy 6 peptide kháng khuẩn thông qua sắc ký lỏng siêu hiệu suất khối phổ (UPLC-QTOF-MS/MS) [289].

Pandian và cs (2018) cho thấy 3 gen: *Chit42*, *Chit2* và *ChitB* được tổng hợp từ chủng *T. asperellum* Ta13. Hoạt tính chitinase cực đại (nồng độ NAGA 93,5 mg/mL)

cho thấy *T. asperellum* Ta13 là một chủng sản xuất chitinase hiệu quả, có tác dụng chống lại các mầm bệnh quan trọng trong nông nghiệp [202].

Gần đây nhất, Deng và cs (2019) đã biểu hiện thành công gen *Chit46* từ *T. harzianum* trên nấm *P. pastoris* với lượng chitinase tái tổ hợp cao là 31,4 U/mL, cao hơn nhiều so với các thông báo trước đó. Chitinase tái tổ hợp (rChit46) thủy phân hiệu quả chitin dạng keo với tỷ lệ chuyển hóa cao 80,5% trong 3 giờ và các sản phẩm thủy phân chitin chủ yếu là (GlcNAc)₂ (94,8%). Ngoài ra, rChit46 cũng ức chế đáng kể sự phát triển của nấm *Botrytis cinerea* [86].

Abu-Tahon và cs (2020) đã tối ưu hóa hoạt tính của chitinase từ *T. viride* AUMC 13021 được phân lập từ đất rừng ngập mặn của khu bảo tồn Ras Mohammed, Ai Cập bằng quá trình lên men chìm. Sản lượng enzyme tối đa (38,33 U/mg protein) thu được trong môi trường có chitin dạng keo 1,4%, maltose 1% và dịch chiết nấm men 1% sau 96 giờ ủ ở 35°C, pH 6,5 với tốc độ lắc 125 vòng/phút. Enzyme đã được tinh chế với hiệu suất 73,1% và hoạt độ 210,16 U/mg protein. Khối lượng phân tử của chitinase tinh sạch là 62 kDa. Chitinase hoạt động tối ưu ở pH 6,5 và 40°C. Hơn nữa, chitinase tinh sạch cho thấy hoạt tính kháng nấm đáng kể đối với *F. oxysporum*, một tác nhân gây bệnh héo rũ ở cà chua [27].

Các nghiên cứu về đặc tính và hoạt tính của chitinase ngoại bào từ các loài *Trichoderma* đã được bắt đầu từ lâu như *T. harzianum* [92], [231], *T. virens* [42]. Tuy nhiên, các nghiên cứu về *T. asperellum* chỉ mới bắt đầu gần đây và chỉ tập trung vào các gen mã hóa chitinase, đặc điểm và hoạt động của nó [37], [157], [158], [182], [202], [289].

Dường như *Trichoderma* là chi nấm đến nay được phát hiện có hoạt tính chitinase khá cao, ứng dụng nhiều trong các lĩnh vực, đặc biệt trong bảo vệ thực vật. Đối với chi nấm *Aspergillus*, cũng có một số công trình nghiên cứu về khả năng sinh chitinase của chúng trên môi trường bán rắn. Những chủng thuộc chi nấm này được nghiên cứu thu nhận chitinase là *A. fumigatus* [290]. Shubakow và Kucheryavykh (2004) đã nghiên cứu nuôi cấy nhiều chủng nấm khác nhau, trong đó có các chủng thuộc chi *Aspergillus* và *Trichoderma*...[245]. Tuy nhiên, những nghiên cứu về chitinase từ nấm mốc phần lớn thực hiện trên môi trường nuôi cấy dịch thể.

1.2.4.2. Ở Việt Nam

Nhìn chung, những nghiên cứu về chitinase trong nước còn rất hạn chế cho dù tiềm năng ứng dụng rộng rãi của enzyme này là không thể phủ nhận.

Chitinase được quan tâm nghiên cứu do những ứng dụng của nó trong việc xử lý

môi trường và khả năng ức chế chống lại nấm bệnh hại cây trồng. Một số công trình đã được công bố như: nghiên cứu chitinase và β -glucanase từ nấm *Trichoderma* spp. và khả năng kiểm soát sinh học đối với một số nấm gây bệnh ở thực vật [11]. Nghiên cứu đặc tính của chitinase thu nhận từ nấm *Coprinus fimentarius* [7], khảo sát một số yếu tố tác động đến quá trình sinh tổng hợp chitinase từ *Trichoderma* sp. [20], nghiên cứu thu nhận chitosanase từ *Streptomyces griceus* [21].

Nguyễn Văn Nam và cs (2010) đã nghiên cứu chức năng của nấm *T. harzianum* T1 phân lập từ đất rừng tự nhiên ở Đắk Lắk trong quá trình đối kháng với nấm bệnh *Fusarium solani*. Enzyme tách từ nấm này có khối lượng phân tử 51 kDa, có khả năng phân hủy thành của bào tử nấm và thủy phân sợi nấm để tạo ra các sản phẩm chitin oligomer [13]. Cùng năm đó, Nguyễn Phương Huệ và cs đã nghiên cứu một số yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp chitinase tái tổ hợp của chủng vi khuẩn *Bacillus circulans* HT11 và đã xác định trình tự gen của chủng này [15]. Phạm Thị Ngọc Lan và cs (2010) đã tuyển chọn từ 150 chủng vi sinh vật phân giải chitin (phân lập từ đất) 2 chủng có hoạt tính chitinase mạnh là C25 và C41 và khảo sát điều kiện sinh trưởng, phát triển và sinh tổng hợp chitinase của các chủng vi khuẩn này [10].

Nguyễn Hoàng Lộc và cs (2011) cũng đã nghiên cứu chủng *T. asperellum* (SH16) phân lập từ các mẫu đất ở Quảng Trị và Thừa Thiên Huế có hoạt tính chitinase mạnh trên môi trường agar chitin. Kết quả, chủng nấm mốc này có hoạt tính chitinase mạnh nhất trong điều kiện nuôi cấy: thời gian 96 giờ, nhiệt độ 40°C, pH môi trường 7. Enzyme tách từ chủng nấm mốc này có khối lượng phân tử khoảng 42 kDa, hoạt tính cao nhất ở pH 7 và nhiệt độ 40°C. Ngoài ra, enzyme này bền trong khoảng pH 3-9 và có khả năng duy trì hoạt tính trong khoảng 10-60°C [158].

1.3. CẢI THIỆN KHẢ NĂNG KHÁNG NẤM CỦA CÂY LẠC BẰNG KỸ THUẬT CHUYỂN GEN

Hai nhóm phương pháp được ứng dụng trong nghiên cứu chuyển gen ở thực vật là chuyển gen trực tiếp và chuyển gen gián tiếp. Trong đó, phương pháp chuyển gen gián tiếp thông qua *A. tumefaciens* đã được ứng dụng phổ biến và thành công đối với cây lạc [182], [234].

1.3.1. Hệ thống vector trong biến nạp gen thông qua *A. tumefaciens*

Vi khuẩn *A. tumefaciens* thường được sử dụng để chuyển DNA ngoại lai vào tế bào thực vật. Từ trình tự Ti-plasmid của *A. tumefaciens*, nhiều vector biến nạp được phát triển bằng cách loại bỏ các trình tự DNA không quan trọng và lắp ráp thêm các gen cần thiết... Hai hệ thống vector chuyển gen hiệu quả, được sử dụng phổ biến là hệ

vector nhị phân (binary vector) và hệ vector liên hợp (co-integrative vector) [185].

- *Hệ vector nhị phân*: Hệ thống vector nhị phân có vùng T-DNA và vùng *vir* nằm trên hai plasmid khác nhau nhưng trong cùng một tế bào *A. tumefaciens* [271].

- *Hệ vector liên hợp*: hệ liên hợp được xây dựng trên cơ sở sự tái tổ hợp giữa vùng tương đồng nằm trên plasmid vi khuẩn (như vector của *E. coli*) với vùng T-DNA trên Ti-plasmid của *A. tumefaciens*. Trong đó, vùng *vir* được giữ lại, vùng mã hóa chức năng gây khối u bị loại bỏ và thay thế bằng những đoạn DNA mới trong Ti-plasmid [161].

1.3.2. Các promoter sử dụng trong chuyển gen thực vật

Nấm gây bệnh cây trồng là một trong những nguyên nhân làm giảm năng suất trên nhiều đối tượng cây trồng quan trọng như lúa, ngô, lạc, đậu tương... Và để đối phó với vấn đề này, công nghệ chuyển gen thực vật được sử dụng và được coi là một công cụ hiệu quả để chuyển các gen ngoại lai nhằm cải thiện nguồn gen cây trồng. Trong phương pháp này, việc lựa chọn sử dụng các promoter khác nhau để kiểm soát mức độ biểu hiện của gen ngoại lai là rất quan trọng [240]. Có nhiều loại promoter khác nhau được sử dụng để kiểm soát mức độ biểu hiện của gen ngoại lai như: promoter thường trực, promoter đặc hiệu mô/tế bào, promoter cảm ứng, promoter nhân tạo. Trong luận án này, hai loại promoter được sử dụng là promoter thường trực và promoter đặc hiệu rễ.

1.3.2.1. Promoter thường trực

Các promoter điều khiển sự biểu hiện của gen không chịu ảnh hưởng của các yếu tố môi trường hay yếu tố phát triển được gọi là promoter thường trực (constitutive promoter). Promoter thường trực thường được sử dụng để biểu hiện protein tái tổ hợp ở tất cả các mô của thực vật. Trong số các promoter thường trực, promoter CaMV 35S (viết tắt 35S) được sử dụng rộng rãi để biểu hiện các protein tái tổ hợp ở mức độ cao [114]. Promoter 35S tạo sự biểu hiện tạm thời (transient) và ổn định (stable) của gen chuyển trong cây. Gen chuyển được biểu hiện ở tất cả các mô, không phụ thuộc vào giai đoạn phát triển của cây và vị trí mô trên cây [265]. Hoạt động của promoter 35S ở cây hai lá mầm hiệu quả hơn so với cây một lá mầm có thể là do sự khác nhau về chất lượng hoặc số lượng của các yếu tố điều hòa.

Theo nghiên cứu của Huy và cs (2016), gen S1D từ virus gây bệnh dịch tả lợn và protein dung hợp tiểu đơn vị B của độc tố đã được tạo dòng trong vector biểu hiện thực vật pMYV717 và pMYV719 với sự điều khiển của promoter duplicated 35S

(dp35S) để biểu hiện tạm thời ở cây thuốc lá *N. benthamiana* với mức độ biểu hiện cao [122].

Promoter ubiquitin cũng là một promoter thường trực được sử dụng phổ biến. Promoter này được phân lập từ nhiều loại cây trồng khác nhau như ngô, *Arabidopsis*, khoai tây, hướng dương, thuốc lá và lúa [247].

Ngoài hai loại promoter nói trên, một số promoter thường trực khác cũng được sử dụng trong chuyển gen như promoter anopine synthase, promoter cryptic và promoter 35S có trình tự tăng cường, promoter actin từ lúa, promoter nopaline synthase để sản xuất các hợp chất sinh học trong thực vật [242].

1.3.2.2. Promoter đặc hiệu mô

Là trình tự DNA tương tác với protein đặc hiệu mô để chỉ huy gen cấu trúc sản xuất ra từng loại protein đặc hiệu của từng mô. Các gen chuyển dưới sự điều khiển biểu hiện của promoter này sẽ chỉ biểu hiện ở mô đặc hiệu, không biểu hiện ở các mô còn lại của cây. Các promoter này giúp tập trung các sản phẩm chuyển gen ở những cơ quan đích như hạt, quả, rễ... mà không ảnh hưởng đến sinh trưởng của các mô, cơ quan còn lại của cây. Một số promoter đã được phân lập để biểu hiện các protein trong một số mô, cơ quan đặc hiệu như ở hạt gồm promoter arcelin, promoter probulin-1, promoter zein từ ngô, promoter globulin 7S, promoter glutelin từ lúa và promoter của tiểu phần α' của β -conglycinin từ đậu tương [242].

1.3.3. Tình hình nghiên cứu về promoter đặc hiệu rễ

Rễ là một trong ba hệ thống cơ quan chính của thực vật, nó không chỉ hấp thụ nước và các chất dinh dưỡng khoáng, dự trữ năng lượng và dẫn các chất dinh dưỡng khoáng đến các cơ quan khác, mà còn tham gia vào quá trình kháng mầm bệnh và khả năng chịu áp lực của môi trường. Biểu hiện gen đặc hiệu ở rễ đóng một vai trò quan trọng trong quá trình sinh trưởng và phát triển của cây [249]. Các promoter đặc hiệu rễ cũng có vai trò quan trọng trong việc điều khiển các gen đặc hiệu rễ biểu hiện để cải thiện sự hấp thụ chất dinh dưỡng và nước, khả năng chịu hạn và khả năng chống chịu các mầm bệnh [132]. Một số gen đặc hiệu rễ đã được phân lập từ nhiều loài thực vật và các promoter của chúng cũng đã được sử dụng để thúc đẩy sự biểu hiện của gen đích trong cây chuyển gen.

Năm 2002, Nan và cs đã sàng lọc và phân lập một gen đặc hiệu rễ từ thư viện bộ gen của *N. tabacum* cv. Wisconsin 38. Kết quả cho thấy rằng trình tự 636 bp từ vị trí bắt đầu phiên mã là đủ để kích hoạt sự biểu hiện GUS đặc hiệu ở rễ thuốc lá. Ở cây

thuốc lá chuyển gen, rễ chính và rễ con đều ngắn và mạnh mẽ, các rễ con được phân bố đồng đều xung quanh rễ chính. Trong khi ở trong cây thuốc lá không chuyển gen, rễ chính mỏng và dài [186].

Năm 2010, Xu và cs đã nghiên cứu tạo dòng promoter *PsPR10* dài 1681 bp được phân lập từ rễ của cây thông (*Pinus strobus*) tương đồng đến 84,5% với trình tự của promoter *PmPR10-1.14*, promoter này đã được cắt bỏ một đoạn trình tự ngắn rồi gắn với gen chỉ thị GUS sau đó chuyển vào cây thuốc lá. Kết quả nghiên cứu cho thấy promoter *PsPR10* thúc đẩy sự biểu hiện của các protein ngoại lai chống lại các điều kiện bất lợi của môi trường so với các loại promoter thường được sử dụng trong thực vật như CaMV 35S, actin (Act1), promoter ubiquitin (RUBQ1 and RUBQ2) and cytochrome c (OsCc1) có mức độ biểu hiện yếu hơn [291].

Năm 2014, Chen và cs đã nghiên cứu về promoter GmPRP2 trong cây thuốc lá, *Arabidopsis* và rễ tơ của cây đậu tương. Promoter GmPRP2 sau khi phân lập từ đậu tương và cắt bỏ một đoạn dài 471 bp ở đầu 5' đã được tạo dòng với gen chỉ thị *GUS* và chuyển vào cây thuốc lá cũng như rễ lông của đậu tương để phân tích hoạt động của promoter. Phân tích mô trong cây thuốc lá chuyển gen và rễ lông của cây đậu tương cho thấy gen *GUS* chủ yếu biểu hiện trong rễ. Biểu hiện của promoter *GmPRP2* được kiểm tra bằng phương pháp real-time PCR từ rễ, thân, lá và hoa. Mức biểu hiện cao nhất là ở rễ, mức độ biểu hiện ở lá và hoa thấp hơn. Vì vậy, kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng promoter *GmPRP2* là promoter đặc hiệu rễ, thúc đẩy sự biểu hiện của gen quan tâm để cải thiện sức đề kháng của rễ hoặc khả năng chống lại mầm bệnh [66].

Các promoter đặc hiệu ở mô là cần thiết để kết hợp các gen kháng côn trùng vào cây trồng bằng cách biến nạp gen để kiểm soát các loài gây bệnh hại trong đất. Geng và cs (2014) đã tạo dòng thành công promoter đặc hiệu rễ Asy. Kết quả cho thấy một số contig phiên mã đặc hiệu rễ có liên quan đến khả năng chống chịu các stress và phản ứng với kích thích của auxin [101].

Năm 2017, Mohan và cs đã thiết kế một promoter đặc hiệu rễ SynR2 bằng cách sử dụng một số yếu tố tác động *cis* (*cis*-acting element) hợp nhất với promoter ngắn (86 bp) từ promoter PortUbi882. Thay promoter CaMV 35S bằng promoter SynR2 để điều khiển sự biểu hiện của GUS. Kết quả nghiên cứu chỉ ra rằng promoter SynR2 thể hiện hoạt tính gen *GUS* cao hơn nhiều so với promoter CaMV 35S, đồng thời sau khi phân tích và tổng hợp kết quả real-time PCR, promoter SynR2 cho thấy biểu hiện đặc hiệu ở rễ cao gấp 2,1 lần so với promoter CaMV 35S [175].

Như vậy, nếu sử dụng hệ thống promoter không đặc hiệu, một gen chuyển cụ thể có thể được biểu hiện quá mức ở thời điểm sinh trưởng, phát triển hoặc ở mô không mong muốn, do đó có thể gây ra những hậu quả không mong muốn đối với sự sinh trưởng và phát triển của cây.

1.3.4. Thay đổi mã di truyền của gen đích cho phù hợp với hệ thống biểu hiện

Sự thay đổi trình tự mã hóa của gen ngoại lai cho phù hợp với hệ thống biểu hiện là một trong những chiến lược quan trọng để tăng cường sự biểu hiện của protein tái tổ hợp [82]. Bằng cách sử dụng phương thức này, Perlak và cs (1991) đã biểu hiện thành công gen *cryIA* (b) của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* trong cây thuốc lá và cây cà chua. Kết quả là sự biểu hiện gen *cryIA* (b) tăng gấp 100 lần so với đối chứng chuyển gen *cryIA* (b) không đổi mã di truyền [212]. Trong một số trường hợp, thay vì thay đổi toàn bộ trình tự của gen chuyển, có thể sử dụng đột biến định hướng. Đột biến định hướng được sử dụng để loại bỏ các codon hiếm bằng cách thay thế một base nitrogen. Tuy nhiên, trong khi thay đổi mã di truyền cần tránh việc mở rộng hoặc tập trung lại các codon phổ biến để không ảnh hưởng đến tốc độ của tRNA. Hệ gen ở thực vật giàu tỷ lệ base nitrogen AU, song sự lặp lại của các trình tự AUUUA được cho là gây sự bất ổn đối với quá trình phiên mã [113].

Ngoài ra, để thúc đẩy sự dịch mã của gen đích trong hệ biểu hiện, các trình tự xung quanh vị trí khởi đầu dịch mã cần được thay đổi để phù hợp với trình tự điều hòa khởi đầu (consensus initiation sequence). Trình tự điều hòa khởi đầu ở thực vật thường ở xung quanh mã khởi đầu AUG, có thể là AACAAUGGC hoặc UAAACAUGGCU, các trình tự này có sự khác biệt so với ở động vật (CACCAUGG) [162].

1.4. ỨNG DỤNG KỸ THUẬT CHUYỂN GEN NHẪM TĂNG CƯỜNG KHẢ NĂNG KHÁNG NẤM Ở CÂY LẠC

1.4.1. Hệ thống tái sinh và quy trình chuyển gen ở cây lạc

1.4.1.1. Các yêu cầu cơ bản đối với hệ thống tái sinh cây

Các mẫu tế bào, mô dùng cho quá trình chuyển gen cần phải có khả năng tái sinh *in vitro* nhanh. Các mô, tế bào này có khả năng tiếp nhận gen mới. Quy trình tái sinh cây phải có hiệu quả cao, không hoặc ít phụ thuộc vào kiểu gen. Cây tái sinh có tỷ lệ sống cao (khi đưa ra ngoài đất trồng), tần số biến dị thấp và khả năng hữu thụ cao để có thể sử dụng làm nguồn nguyên liệu ban đầu nhằm tiếp tục tiến hành các thí nghiệm ở các thế hệ tiếp theo. Như vậy, có thể thấy hoàn thiện hệ thống tái sinh là điều kiện tiên quyết để thực hiện thành công quá trình biến nạp gen ở thực vật.

Lạc là cây lấy dầu và protein chất lượng cao. Vì vậy, đã có nhiều nghiên cứu nhằm xây dựng một hệ thống tái sinh cây hoàn thiện từ nhiều nguồn mẫu ban đầu khác nhau [102], [266]. Nhiều khó khăn trong chuyển đổi di truyền ở lạc bao gồm các yếu tố như: tái sinh kém, thời gian tái sinh dài, thường thông qua một giai đoạn mô sẹo và chịu ảnh hưởng của kiểu gen trên các hệ thống tái sinh... [47]. Vì vậy, tối ưu hệ thống tái sinh là một trong những bước quyết định ảnh hưởng đến kết quả của quá trình chuyển gen.

Nguồn mẫu vật ban đầu được sử dụng cho các nghiên cứu tái sinh cây ở lạc rất đa dạng như từ phôi hữu tính, lá non, lá mầm, phần trụ của lá mầm, đoạn thân... Các mẫu vật này được sử dụng trong hệ thống tái sinh thông qua hai con đường như ở các đối tượng thực vật khác: tái sinh trực tiếp hoặc qua giai đoạn mô sẹo và tái sinh thông qua hình thành phôi soma trên các môi trường thích hợp.

Tái sinh chồi trực tiếp theo con đường thứ nhất từ mẫu vật là lá mầm, mảnh lá, mắt (nốt) lá mầm (cotyledon node) là một trong những phương pháp có hiệu quả được sử dụng gần đây trong tái sinh và chuyển gen ở một số loài thực vật thuộc cây họ đậu như đậu tương [195] và lạc [102]. Giai đoạn cảm ứng tạo chồi là giai đoạn quan trọng trong quá trình phát triển chồi trực tiếp từ mắt lá mầm. Môi trường cảm ứng tạo chồi ở đa số các loài thực vật thường sử dụng các chất điều hòa sinh trưởng thuộc nhóm auxin và cytokinin như IAA, IBA, BAP... Trong đó, BAP thuộc nhóm kích thích sinh trưởng cytokinin được sử dụng phổ biến để cảm ứng tạo chồi ở nhiều loài thực vật khác nhau [29]. Akasaka và cs (2000) đã tái sinh chồi thành công từ mảnh lá giống lạc Chico trên môi trường có bổ sung các chất kích thích sinh trưởng như BAP, KIN [29]. Sharma và cs (2000), đã tái sinh chồi thành công trực tiếp từ nuôi cấy lá mầm trưởng thành của các giống lạc khác nhau với tỷ lệ tái sinh hơn 90% [243]. Anuradha và cs (2006) đã thành công trong việc tái sinh đa chồi trực tiếp từ các mắt lá mầm của giống lạc JL-24 với tỷ lệ tái sinh là 82% [34]. Quá trình tái sinh theo con đường thứ nhất sử dụng nguồn mẫu ban đầu trải qua quá trình mô sẹo hóa đã được đề cập đến trong nhiều nghiên cứu trên đối tượng cây lạc [17], [22]. Các mẫu vật được sử dụng có thể là phôi trực, lá non, đoạn thân... Sau khi mẫu cấy được xử lý và đưa lên môi trường tạo mô sẹo thích hợp, thường là chứa chất KTST thuộc nhóm auxin (2,4-D) với thời gian nuôi cấy nhất định sẽ tạo khối mô sẹo. Phôi trực là mẫu vật được sử dụng tạo mô sẹo phổ biến hơn cả. Tuy nhiên, quá trình tái sinh cây trực tiếp từ khối mô sẹo có nguồn gốc từ phôi hữu tính cho tỷ lệ đa chồi rất thấp. Thường từ khối mô sẹo chỉ phát sinh được một chồi, chỉ một số ít tạo hai chồi. Điều này không có ý nghĩa cho quá trình chuyển gen do cần phải có tỷ lệ tái sinh chồi cao nhằm tăng hiệu quả hình thành cây mang gen

chuyển mong muốn. Vì vậy, con đường thứ hai giải quyết vấn đề này là từ khối mô sẹo có thể chuyển lên môi trường tạo phôi soma. Khối phôi soma hình thành trên môi trường thích hợp sẽ được tái sinh tạo cây hoàn chỉnh. Con đường tái sinh này đã làm tăng hiệu quả tạo đa chồi từ một phôi trực hạt lạc [18].

Nhiều nghiên cứu đã cho thấy, trong quá trình phát sinh phôi soma, môi trường có chất 2,4-D với nồng độ cao cho kết quả tạo phôi soma tốt nhất trên cây lạc [17]. Bên cạnh đó, nhiều nghiên cứu đã nhận thấy, việc tối ưu nồng độ và thời gian tiếp xúc với auxin (2,4-D) là rất quan trọng cho sự hình thành và phát triển của phôi soma [248]. Việc kết hợp các chất kích thích sinh trưởng như BAP và KIN, BAP và NAA với nồng độ khác nhau đã đem lại kết quả tái sinh tốt từ phôi soma có hình dạng bất thường. Nghiên cứu của Bùi Văn Thắng và cs (2004), trên môi trường phục hồi phát triển phôi thích hợp, tỷ lệ tái sinh cây thu được rất cao (82%) [17]. Đã có nhiều công trình chuyển gen trên cây lạc được công bố trên thế giới. Nguồn mẫu vật ban đầu được sử dụng phổ biến thường là lá mầm [49], mắt lá mầm [34], [47], phôi trực, mô sẹo phôi [39]. Ngoài ra, lá chết non [264] hoặc trực của lá mầm [218] cũng được sử dụng làm nguồn mẫu vật để chuyển gen. Từ các mẫu vật này, có thể sử dụng phương pháp chuyển gen trực tiếp như bắn gen hoặc chuyển gián tiếp qua *Agrobacterium* nhằm tạo ra cây lạc chuyển gen mang các tính trạng mong muốn.

1.4.2. Tình hình nghiên cứu chuyển gen chitinase vào cây lạc nhằm nâng cao khả năng kháng nấm

Chitinase được tổng hợp từ rất nhiều nguồn sinh vật khác nhau trong tự nhiên như thực vật, động vật và vi sinh vật. Trong đó, vi sinh vật được xem là nguồn cung cấp chitinase nhiều hơn so với động vật và thực vật [7].

1.4.2.1. Những nghiên cứu liên quan ở trên thế giới

Hiện nay, hướng nghiên cứu chuyển gen mã hóa chitinase của thực vật hoặc vi sinh vật vào cây trồng để cải thiện khả năng kháng nấm bệnh đã được nghiên cứu [187], [239], [258]. Các gen mã hóa chitinase có khả năng kháng nấm bệnh đã được chú ý ở nhiều loài cây trồng khác nhau nhưng ở cây lạc vẫn còn ít. Đến nay, mới chỉ có một vài trường hợp chuyển gen chitinase của lúa hoặc thuốc lá vào cây lạc như gen chitinase 26 kDa (*rcg3*) ở lúa kháng nấm *A. flavus* [239], kháng bệnh đốm lá do *Cercospora arachidicola* [124] hoặc *Cercosporadium personatum* [30] gây ra. Gen chitinase của thuốc lá kháng bệnh đốm lá [228], gen chitinase của lúa kháng bệnh thối hạch do nấm *S. minor* [49], gen chitinase (*Chi11*) của lúa kháng nấm *Phaeoisariopsis personata* [47] và gen chitinase (*Rchit*) của lúa kháng nấm *A. flavus* [213].

1.4.2.2. Những nghiên cứu liên quan ở Việt Nam

Những nghiên cứu trong nước theo hướng biểu hiện gen chitinase ngoại lai ở cây trồng cũng còn ít. Bùi Thị Lan Hương và cs (2009) đã chuyển gen chitinase phân lập từ giống đậu cô ve Saxa (*Phaseolus vulgaris* cv. Saxa) vào giống cà chua P375 (*L. esculentum* cv. P375). Kết quả mới dừng lại ở phân tích PCR để xác định sự hiện diện của gen chuyển trong 2 cây tái sinh (T₀) [9]. Lê Thị Thu Hiền (2014) đã chuyển thành công gen mã hóa chitinase *TcChi1* phân lập từ bộ gen cây ca cao (*Theobroma cacao*) vào dòng ca cao thương mại TD8. Kết quả thu được 2 cây chuyển gen ở thế hệ T₀ là TD8/pCB/TcChi1/2 và TD8/pCB/TcChi1/3 [6]. Tuy nhiên, hiệu quả chuyển gen chỉ được đánh giá ở mức độ lai Southern. Các phân tích biểu hiện gen ở mức độ phân tử (phiên mã và dịch mã) cũng như ở điều kiện *in vivo* chưa được thực hiện. Vì vậy, hướng nghiên cứu chuyển gen chitinase của *Trichoderma* vào cây lạc để tăng tính kháng nấm là một giải pháp hiệu quả, thân thiện với môi trường và hiện đang được quan tâm ứng dụng trên nhiều đối tượng cây trồng khác.

CHƯƠNG 2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. NGUYÊN LIỆU NGHIÊN CỨU

2.1.1. Nguyên liệu thực vật

Giống lạc (*A. hypogaea* L.) L14 (Hình 2.1) được mua từ Công ty cổ phần Giống cây trồng-Vật nuôi Thừa Thiên Huế. Đây là giống lạc có thời gian sinh trưởng trung bình 120-135 ngày ở vụ xuân, 110-115 ngày trong vụ thu đông, khối lượng 100 quả đạt 160-165 g, khối lượng 100 hạt đạt 56-60 g, năng suất từ 40-55 tạ/ha, chống chịu hạn, kháng bệnh trên lá và bệnh héo xanh vi khuẩn khá cao [19].

Cây *Nicotiana benthamiana* (Hình 2.2) do Phòng thí nghiệm Sinh học phân tử thực vật (Đại học Quốc Gia Jeonbuk, Hàn Quốc) cung cấp. Cây *N. benthamiana* là một loại cây thân thảo có đặc điểm sinh trưởng nhanh, dễ trồng, phát triển mạnh. Lá của cây *N. benthamiana* có hình bầu dục và nhọn ở đầu, lá rất mỏng và có thể dễ dàng thực hiện các phương pháp chuyển gen thông qua lá. Vì vậy cây *N. benthamiana* được sử dụng rộng rãi trong các nghiên cứu sinh học phân tử và công nghệ sinh học [87].



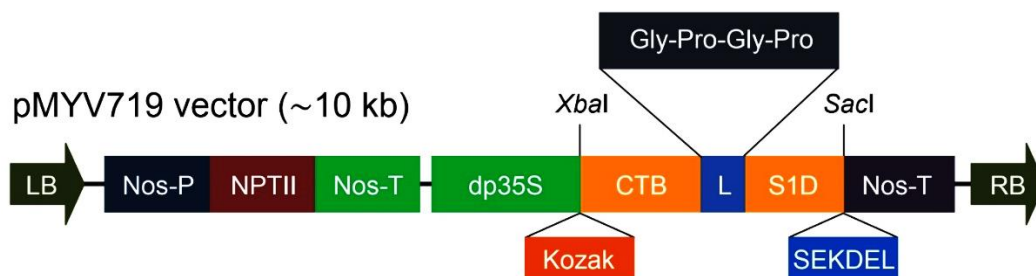
Hình 2.1. Quả và hạt của giống lạc L14.



Hình 2.2. Cây *N. benthamiana*

2.1.2. Các vector, chủng vi khuẩn và vi nấm

- Vector biểu hiện thực vật pMYV719 mang promoter dp35S (dài khoảng 11 kb) (Hình 2.3) và vector pMYV508 chứa gen *p19* mã hóa một protein ức chế gen im lặng của virus còi cọc ở cà chua (TBSV) (Hình 2.4) được cung cấp bởi GS. Yang Moon-Sik (Đại học Quốc gia Jeonbuk, Hàn Quốc).



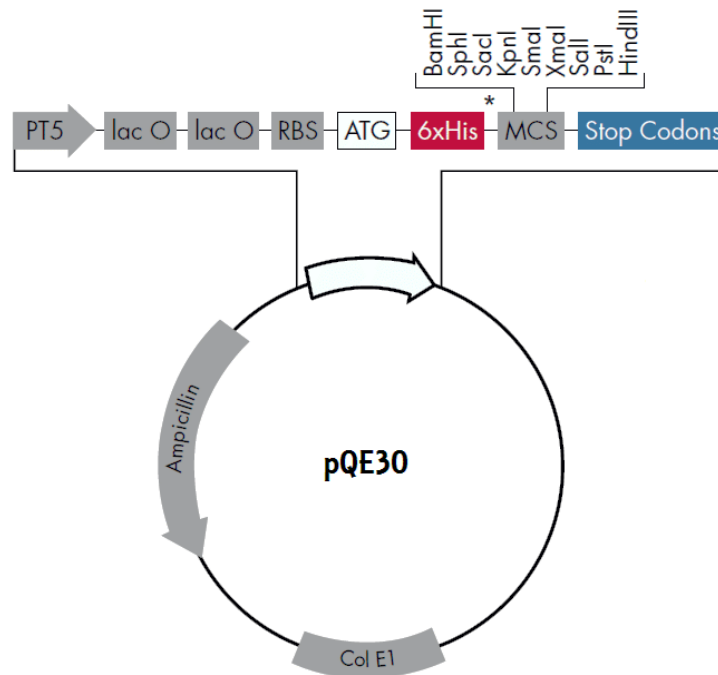
Hình 2.3. Vector pMYV719. LB: biên trái, RB: biên phải, S1D: vùng epitope, CTB: tiểu đơn vị B của độc tố tả, dp35S: promoter CaMV 35S kép, Nos-T: terminator của nopaline synthase, Nos-P: promoter của nopaline synthase, Kozak: trình tự liên ứng, SEKDEL: trình tự Ser-Glu-Lys-Asp-Glu-Leu đã được chứng minh là một tín hiệu dẫn đến lưu giữ ít nhất hai protein trong lưới nội chất, NPTII: gen neomycin phosphotransferase II, L: trình tự Gly-Pro-Gly-Pro. Trình tự CTB-L-S1D bao gồm trình tự Kozak và SEKDEL sẽ bị loại bỏ khỏi vector pMYV719 bởi *XbaI* và *SacI*. Các gen mã hóa chitinase 42 kDa sau đó sẽ được chèn vào vector tại vị trí này.



Hình 2.4. Vector pMYV508. RB và LB: biên phải và biên trái của vùng T-DNA, CaMV: virus khảm súp lơ, Hyg^R: gen mã hóa hygromycin phosphotransferase kháng hygromycin, pDu35S: promoter CaMV 35S kép, *p19*: gen ức chế protein *p19* từ virus gây bệnh lùn cà chua, pVS1 StaA: protein ổn định từ plasmid pVS1 cần thiết cho sự phân ly ổn định plasmid ở *Agrobacterium*, pVS1 repA: protein sao chép từ plasmid pVS1 cho phép sao chép plasmid với số bản sao thấp trong *Agrobacterium*, pVS1 oriV: vùng sao chép từ plasmid pVS1 cho phép sao chép plasmid với số bản sao thấp trong *Agrobacterium*, Bom: vùng dịch chuyển từ pBR322, Ori: vùng khởi đầu sao chép, Kan^R: gen kháng kanamycin.

- Promoter đặc hiệu rễ Asy (pAsy) dài 562 bp [101] (Phụ lục 1) chứa vị trí *HindIII* ở đầu 5' và *XbaI* ở đầu 3' được tổng hợp và được tạo dòng trong vector pUC19 bởi Công ty TNHH MTV Hóa sinh Phù Sa (Cần Thơ, Việt Nam).

- Vector biểu hiện *E. coli* pQE30 (Qiagen, Đức) (Hình 2.5).



Hình 2.5. Vector pQE30. PT5: promoter T5, lac O: operator Lac, 6xHis: trình tự mã hóa 6xHis, MCS (multiple cloning site): các vị trí tạo dòng, Col E1: vùng sao chép.

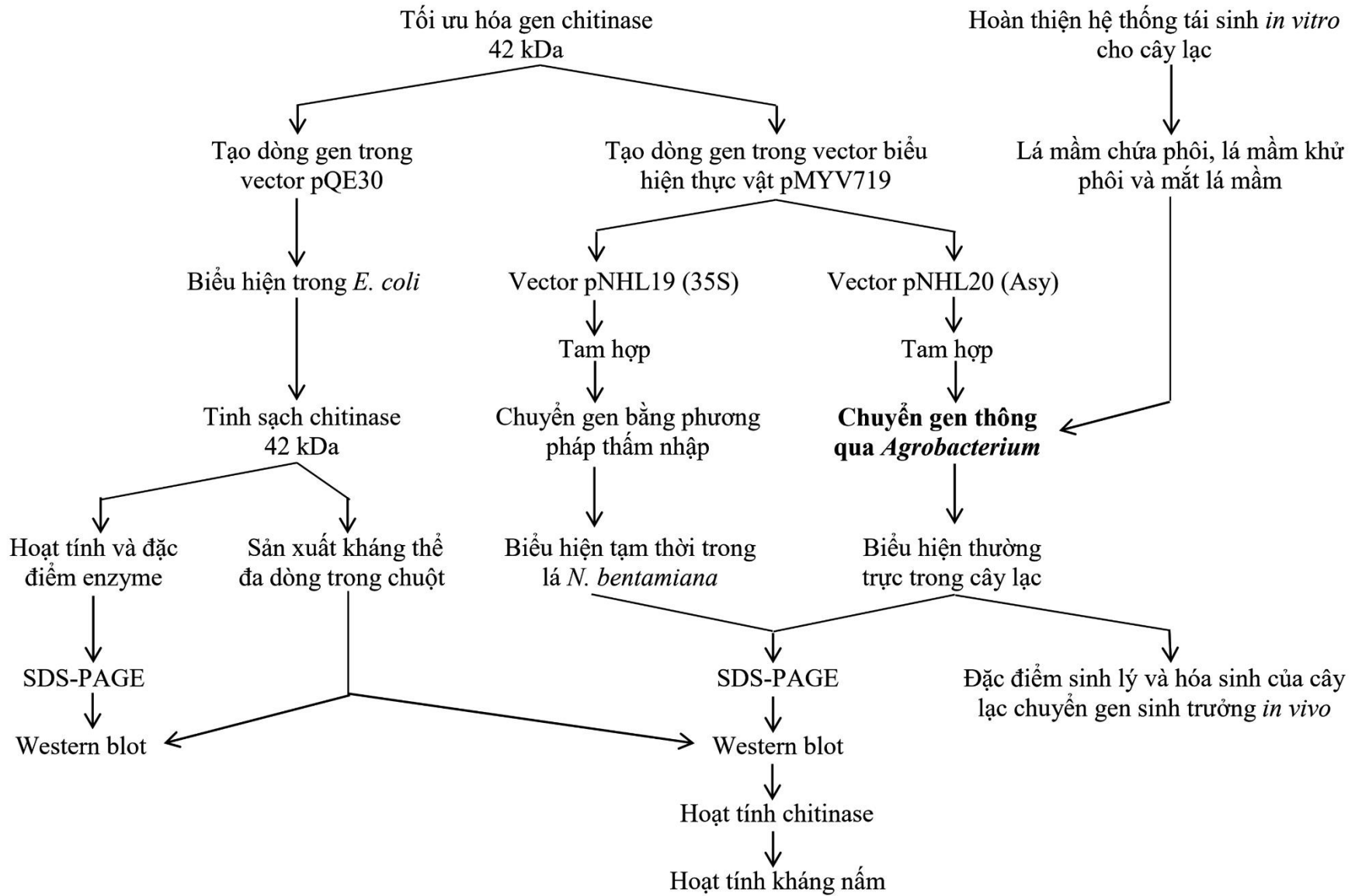
- Các gen mã hóa chitinase 42 kDa có mang trình tự peptide tín hiệu của gen amylase 3D ở lúa [136] (Phụ lục 2), bao gồm *Chi42* (NCBI: HM191683.1) là gen hoang dại từ chủng *T. asperellum* SH16 [158], *syncodChi42-1* (NCBI: MT083802.1) và *syncodChi42-2* (NCBI: MT083803.1) là 2 gen có nguồn gốc từ gen *Chi42* đã được tối ưu hóa bộ ba sử dụng cho biểu hiện thực vật (dài khoảng 1,3 kb bao gồm cả đoạn peptide tín hiệu) được tổng hợp và tạo dòng trong vector pUC19 bởi Công ty TNHH MTV Hóa sinh Phù Sa (Cần Thơ, Việt Nam).

- Các chủng vi khuẩn *E. coli* M15, *E. coli* TOP10 và *A. tumefaciens* LBA4404 do Viện nghiên cứu Hoạt chất sinh học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế cung cấp.

- Chủng nấm *Sclerotium rolfsii* do Bộ môn Bảo vệ thực vật, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế cung cấp.

2.2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Sơ đồ thí nghiệm tổng quát được trình bày ở hình 2.6.



Hình 2.6. Sơ đồ thí nghiệm tổng quát.

2.2.1. Hoàn thiện hệ thống tái sinh *in vitro* giông lạc L14

2.2.1.1. Khử trùng hạt lạc

Chọn những hạt lạc to, mẩy, vỏ sáng, không sây sát và đồng đều. Rửa hạt bằng nước xà phòng loãng 3 lần, mỗi lần 15 phút, sau đó rửa lại nhiều lần dưới dòng nước chảy. Hạt lạc trước tiên được khử trùng sơ bộ bằng cồn 70% (v/v) trong 1 phút tiếp theo bằng một trong các dung dịch khử trùng HgCl₂ (0,1-0,2%, w/v), NaOCl (60-65%, v/v) hoặc AgNO₃ 0,1% (w/v) từ 5-15 phút, cuối cùng rửa bằng nước cất vô trùng 4-5 lần. Hạt lạc sau khi khử trùng được ngâm trong nước cất vô trùng 24 giờ trong tối trước khi cho nảy mầm *in vitro*.

Hiệu quả khử trùng được đánh giá thông qua tỷ lệ mẫu nhiễm, tỷ lệ mẫu chết và tỷ lệ mẫu sống không nhiễm sau 4 tuần theo dõi. Mỗi công thức quan sát 30 mẫu.

2.2.1.2. Nảy mầm *in vitro* hạt lạc

Hạt lạc sau khi xử lý với dung dịch khử trùng thích hợp được nảy mầm trên môi trường MS cơ bản [179] (Phụ lục 3) có sucrose 3% và agar 0,8% theo 3 cách khác nhau: để nguyên hạt có vỏ lụa, để nguyên hạt nhưng loại bỏ vỏ lụa, loại bỏ vỏ lụa và tách đôi hạt để lấy phần lá mầm có chứa phôi. Hiệu quả nảy mầm của hạt được đánh giá sau 4 tuần nuôi. Mỗi công thức quan sát 100 mẫu, đánh giá ngày nhú mầm, ngày lên cây, tỷ lệ lên cây sau 10 ngày.

2.2.1.3. Tái sinh chồi từ các bộ phận khác nhau của cây lạc *in vitro*

Chồi đỉnh (1 cm), trụ trên lá mầm (1 cm), trụ dưới lá mầm (1 cm) và mắt lá mầm (1 cm) của cây *in vitro* được cấy lên môi trường MS có sucrose 3%, agar 0,8%, bổ sung thêm BAP từ 1-10 mg/L và NAA từ 0,1-0,5 mg/L để thăm dò khả năng tái sinh chồi. Các chồi *in vitro* sau đó được chuyển sang môi trường MS chứa sucrose 3%, agar 0,8%, bổ sung thêm BAP 1-5 mg/L để nhân chồi. Các lá mầm chứa phôi và lá mầm khử phôi cũng được nuôi cấy trực tiếp trên môi trường này để thăm dò khả năng nhân chồi. Các chồi *in vitro* (khoảng 3 cm) tách từ cụm chồi được nuôi cấy trên môi trường MS chứa sucrose 3%, agar 0,8%, bổ sung thêm NAA hoặc IBA từ 0,1-0,5 mg/L để thăm dò khả năng tạo rễ.

2.2.2. Tối ưu hóa trình tự gen *Chi42*

Trình tự peptide tín hiệu của gen *Chi42* được xác định bằng chương trình Expasy SignalP để loại bỏ trước khi tối ưu hóa gen bằng chương trình COOL. Thuật toán tối ưu bao gồm tối đa hóa ngữ cảnh codon (codon context), không sử dụng codon riêng lẻ để làm mất ổn định cấu trúc thứ cấp mRNA ở đầu tận cùng 5' và hạn chế sự hiện diện

của các trình tự nhận biết cho enzyme cắt hạn chế. Hai trình tự có bộ ba tối ưu hóa cao đã được chọn ngẫu nhiên và đặt tên là *syncodChi42-1* và *syncodChi42-2*. Các vị trí nhận biết cho *XbaI* và *BamHI* được bổ sung vào đầu 5' và *SacI* vào đầu 3' của các gen *Chi42*, *syncodChi42-1* và *syncodChi42-2*. Các gen này được tổng hợp và tạo dòng trong vector pUC19 tại vị trí *XbaI* và *SacI* bởi Công ty TNHH MTV Hóa sinh Phù Sa (Cần Thơ, Việt Nam).

2.2.3. Sản xuất kháng thể đa dòng kháng chitinase 42 kDa

2.2.3.1. Tạo dòng các gen chitinase 42 kDa trong vector pQE30

Các gen chitinase 42 kDa được tách dòng khỏi vector pUC19 bằng *BamHI* và *SacI* (Thermo Fisher Scientific, Mỹ). Vector biểu hiện *E. coli* pQE30 (Qiagen, Đức) cũng được mở vòng bởi 2 enzyme tương tự. Các sản phẩm cắt hạn chế sau đó được tinh sạch bằng GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Phản ứng gắn giữa các gen chitinase 42 kDa và vector pQE30 vòng hở được thực hiện nhờ T4 DNA ligase (Promega, Mỹ) và ủ ở 16°C qua đêm sau đó biến nạp vào *E. coli* M15 bằng phương pháp shock nhiệt [230]. Sự hiện diện của các vector tái tổ hợp pQE30/*Chi42*, pQE30/*syncodChi42-1* và pQE30/*syncodChi42-2* trong *E. coli* được kiểm tra bằng phản ứng cắt hạn chế với *BamHI* và *SacI*.

2.2.3.2. Phân tích biểu hiện và tinh sạch chitinase 42 kDa

Các tế bào *E. coli* mang các vector tái tổ hợp nuôi cấy trong môi trường LB (Phụ lục 4) ở 37°C qua đêm với tốc độ lắc 180 vòng/phút đã được cảm ứng với 0,5 mM IPTG trong 4 giờ để biểu hiện chitinase 42 kDa (Ta-CHI42). Mức độ biểu hiện của enzyme được kiểm tra sơ bộ bằng điện di SDS-PAGE 12%.

Do 3 gen chitinase 42 kDa (*Chi42*, *syncodChi42-1* và *syncodChi42-2*) mã hóa cùng 1 loại enzyme nên nghiên cứu này chỉ chọn dòng tế bào *E. coli* mang gen *syncodChi42-1* để sản xuất và tinh sạch Ta-CHI42. Các bước tinh sạch trong điều kiện biến tính (để tiêm enzyme vào chuột) được thực hiện với QIAexpressionist™ Kit (Qiagen, Đức) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Tóm tắt như sau: Sinh khối tế bào *E. coli* chứa vector pQE30/*syncodChi42-1* được giữ ở -80°C, sau đó rã đông và ly giải trong đệm urea (pH 8) (100 mM NaH₂PO₄, 10 mM Tris-HCl, 8 M urea và 10 mM imidazole) bằng cách khuấy liên tục ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Dịch ly giải (Ta-CHI42 thô) được ly tâm 14.000 vòng/phút ở 4°C trong 10 phút. Thể nổi thu hồi được tinh sạch bằng cột poly-prep (Bio-Rad, 7311550) với Ni-NTA agarose (Qiagen, 30210). Cột sau đó được rửa bằng 20 mM imidazole và rửa giải với 250 mM

imidazole trong đệm urea. Dịch chiết enzyme Ta-CHI42 thô được tinh sạch ở điều kiện không biến tính (dùng để xác định hoạt tính và đặc điểm enzyme) tương tự như trường hợp biến tính nhưng không có urea. Độ tinh sạch của Ta-CHI42 được kiểm tra bằng điện di SDS-PAGE 12%. Enzyme Ta-CHI42 tinh sạch được thẩm tích bằng đệm phosphate (pH 7.4), rồi trộn với 30% glycerol và bảo quản ở -20°C trước khi sử dụng cho các thí nghiệm tiếp theo.

Điện di SDS-PAGE 12% (Phụ lục 5) được thực hiện như sau: Chuẩn bị separating gel 12% (4 mL dung dịch acrylamide 30%, 2,6 mL đệm separating gel 4x, 3,3 mL nước cất, 100 μ L APS 10% và 6 μ L TEMED) và stacking gel 5% (0,83 mL dung dịch acrylamide 30%, 0,68 mL đệm stacking gel 4x, 2,3 mL nước cất, 50 μ L APS 10% và 6 μ L TEMED). 50 μ g protein hòa tan tổng số được biến tính ở 95°C trong 10 phút. Mẫu sau đó được nạp vào giếng và chạy điện di ở 60 V trong 30 phút đối với stacking gel và 80 V trong 100 phút đối với separating gel. Sau khi điện di, gel được nhuộm với Coomassie Brilliant Blue trong 15 phút và rửa 3 lần với dung dịch rửa gel (Phụ lục 5).

2.2.3.3. Sản xuất kháng thể

Kháng thể đa dòng kháng Ta-CHI42 được sản xuất theo phương pháp của Cooper và Patterson (2009) với một vài cải tiến [76]. Kháng nguyên đích (Ta-CHI42) tinh sạch được tiêm vào dưới da chuột thuần chủng Balb/c (Charles River Laboratory) cùng với tá dược Freund (tá dược hoàn chỉnh cho chất bổ trợ chính và tá dược không hoàn chỉnh để tăng cường, với tỷ lệ trộn 1:1, v/v). Quá trình nhũ hóa kháng nguyên đạt được bằng cách trộn tá dược với kháng nguyên bằng ống tiêm kép. Mỗi con chuột được tiêm khoảng 50 μ g kháng nguyên tinh sạch. Việc tiêm tăng cường được thực hiện sau 4 tuần kể từ lần tiêm trước. Kháng thể thu được bằng cách lấy máu ở hốc mắt những con chuột sau tiêm 6 ngày rồi trộn với glycerol 50% và NaN₃ 0,2%, hỗn hợp được bảo quản ở 4°C. Tính đặc hiệu và hiệu quả của kháng thể được kiểm tra bằng Western blot, trong đó mỗi kháng thể được pha loãng 1:2000.

Phân tích Western blot được thực hiện như sau: Tiến hành điện di SDS-PAGE 12% trên 2 gel, cơ bản như đã mô tả ở mục 2.2.3.2. Sau khi điện di, một gel được nhuộm với Coomassie Brilliant Blue, gel còn lại được dùng để thẩm tích (blotting) protein lên màng Hybond-C extra nitrocellulose (Amersham Biosciences, Amersham) trong đệm chuyển (Phụ lục 6) trong 3 giờ ở cường độ dòng điện 145 mA bằng thiết bị mini-transblot (BioRad, Mỹ). Tiếp theo, màng được blocking bằng 5% skim milk pha trong đệm TBST (Sigma-Aldrich) trong 1 giờ ở 37°C có lắc nhẹ để ngăn cản các liên kết không đặc hiệu. Sau đó, rửa màng bằng đệm TBST 3 lần, mỗi lần 15 phút. Ủ màng

với kháng thể 1 đa dòng (kháng Ta-CHI42 của chuột) được pha loãng 1:2000 trong đệm TBST trong 2 giờ ở 37°C có lắc nhẹ. Rửa màng với đệm TBST 3 lần, mỗi lần 15 phút. Ủ màng trong đệm TBST chứa kháng thể 2 là kháng thể chuột cộng hợp alkaline phosphatase (AbD Serotec, Bio-Rad, Mỹ) được pha loãng 1:5000 trong 2 giờ ở 37°C có lắc nhẹ. Rửa màng bằng đệm TBST 3 lần. Cân bằng màng trong đệm TMN (100 mM Tris pH 9,5, 5 mM MgCl₂ và 100 mM NaCl) trong 10 phút. Phát triển màu bằng cơ chất BCIP/NBT (Sigma-Aldrich, Cat No B6404) 2-3 phút trong tối ở 37°C.

2.2.4. Xác định hoạt tính và đặc điểm của Ta-CHI42

2.2.4.1. Hoạt tính của Ta-CHI42

Hoạt tính thủy phân chitin được đánh giá sơ bộ bằng cách cho Ta-CHI42 vào các lỗ đục sẵn trên đĩa Petri có chứa agar 1,5% và colloidal chitin 1,2%. Đĩa được ủ ở 4°C trong 8 giờ để khuếch tán enzyme, sau đó ủ ở 28°C trong 6 giờ để thủy phân chitin. Sự xuất hiện của vòng phân giải chitin được xác định bằng cách nhuộm đĩa thạch với Lugol 0,1% (Himedia) [60]. Colloidal chitin được chuẩn bị theo phương pháp của Murthy và Bleakley (2012) [180]. Kích thước vòng phân giải được tính theo công thức $D-d$, với D là đường kính vòng phân giải, d là đường kính lỗ đục.

Hoạt độ chitinase được đo bằng phương pháp quang phổ ở bước sóng 420 nm theo Tsujibo và cs (1998) với cơ chất là p NP- β -GlcNAc (Sigma-Aldrich, Mỹ) [272]. Phản ứng được thực hiện bằng cách thêm 70 μ L (50 μ g) Ta-CHI42 tinh sạch vào 140 μ L dung dịch p NP- β -GlcNAc 2,5 mM hòa tan trong đệm acetate 50 mM (pH 7) và hỗn hợp được ủ ở 50°C trong 10 phút. Sau đó, phản ứng được dừng bằng cách thêm vào hỗn hợp 1,4 mL Na₂CO₃ 0,2 M. Một đơn vị hoạt độ của chitinase được định nghĩa là lượng enzyme cần thiết để giải phóng 1 μ mol p -nitrophenol từ cơ chất p NP- β -GlcNAc trong 1 mL trong thời gian 1 phút. p -nitrophenol (Sigma-Aldrich, Mỹ) được sử dụng để xây dựng đường chuẩn ở độ hấp thụ quang 420 nm. Hoạt độ riêng của chitinase là số đơn vị enzyme trên mỗi mL chia cho nồng độ protein tính bằng mg/mL.

2.2.4.2. Đặc điểm của Ta-CHI42

Nhiệt độ và pH tối ưu cho hoạt động của enzyme Ta-CHI42 được khảo sát trong khoảng 25-70°C và 4-10. Các dung dịch đệm được sử dụng để xác định pH tối ưu là 20 mM đệm citrate (pH 4-6), 20 mM đệm phosphate (pH 7-8) và 20 mM đệm glycine-NaOH (pH 9-10). Độ ổn nhiệt và pH của Ta-CHI42 được đánh giá bằng cách ủ enzyme trong 30 phút ở 25-70°C (pH 7) và pH 4-10 (45°C) mà không có cơ chất, dung dịch enzyme ngay sau đó được làm lạnh đến 4°C. Ảnh hưởng của ion kim loại và một số thuốc thử lên hoạt tính của Ta-CHI42 được xác định bằng cách ủ enzyme ở nhiệt độ và pH thích hợp trong 30 phút với 5 mM ion kim loại (Na⁺, Fe²⁺, Mg²⁺, Cu²⁺, Co²⁺,

Ca²⁺, Zn²⁺, Mn²⁺ hoặc Fe³⁺) hoặc với các thuốc thử như SDS 1%, EDTA 1 mM, urea 1 M, DMSO 5% hoặc Triton X-100 1%. Hoạt tính của chitinase sau khi ủ được xác định như mô tả ở trên nhưng ở nhiệt độ và pH tối ưu. Dung dịch enzyme đun sôi được sử dụng làm mẫu trắng (blank). Hoạt độ tương đối (%) của Ta-CHI42 là tỷ số giữa hoạt độ của enzyme sau khi xử lý (ở các pH và nhiệt độ khác nhau hoặc với các ion kim loại và thuốc thử khác nhau) với hoạt độ ở 50°C và pH 7 (điều kiện tối ưu).

2.2.5. Tạo dòng gen chitinase và promoter Asy trong vector biểu hiện thực vật

2.2.5.1. Tạo dòng gen chitinase trong vector pMYV719

Các gen chitinase 42 kDa được tách dòng từ vector pUC19 tái tổ hợp bằng *Xba*I và *Sac*I. Vector pMYV719 mang promoter 35S (dp35S) (Hình 2.2) được loại bỏ trình tự CTB-L-SD1-SEKDEL cũng bằng 2 enzyme nói trên để thay bằng một trong 3 gen chitinase 42 kDa. Các sản phẩm cắt hạn chế được tinh sạch bằng GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Mỹ) trước khi thực hiện phản ứng gắn bằng T4 DNA ligase (Promega, Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các hỗn hợp phản ứng gắn được biến nạp vào tế bào *E. coli* TOP10 bằng phương pháp shock nhiệt [230]. Các vector tái tổ hợp pMYV719/*Chi42* (được đặt tên là pNHL19.1), pMYV719/*syncodChi42-1* (pNHL19.2) và pMYV719/*syncodChi42-2* (pNHL19.3) hiện diện trong *E. coli* được kiểm tra bằng phản ứng cắt hạn chế với *Xba*I và *Sac*I.

2.2.5.2. Tạo dòng gen chitinase và promoter Asy trong vector pMYV719

Promoter đặc hiệu rễ Asy (pAsy) được tách dòng từ vector pUC19 bằng *Hind*III và *Xba*I để thay cho promoter 35S (dp35S) ở vector pMYV719 (Hình 2.2) cũng được loại bỏ bởi 2 enzyme tương tự trên. Các gen chitinase được tách dòng từ vector pUC19 tái tổ hợp bằng *Xba*I và *Sac*I. Vector tái tổ hợp pMYV719/pAsy được loại bỏ trình tự CTB-L-SD1-SEKDEL (khoảng 1 kb) cũng bằng 2 enzyme nói trên để thay bằng 1 trong 3 gen chitinase. Các sản phẩm cắt hạn chế được tinh sạch bằng GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, Mỹ) trước khi thực hiện phản ứng gắn nhờ T4 DNA ligase. Các hỗn hợp phản ứng gắn được biến nạp vào tế bào *E. coli* TOP10 bằng phương pháp shock nhiệt [230]. Các vector tái tổ hợp pMYV719/pAsy/*Chi42* (được đặt tên là pNHL20.1), pMYV719/pAsy/*syncodChi42-1* (pNHL20.2) và pMYV719/pAsy/*syncodChi42-2* (pNHL20.3) hiện diện trong *E. coli* TOP10 được kiểm tra bằng phản ứng cắt hạn chế.

2.2.6. Tam hợp

Các vector biểu hiện thực vật mang các gen chitinase khác nhau được biến nạp vào *A. tumefaciens* LBA4404 bằng phương pháp tam hợp (triparental mating) theo

Van Haute và cs (1983) [279]. Ba chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* LBA4404, *E. coli* TOP10 mang helper plasmid pRK2013 và các *E. coli* TOP10 riêng rẽ mang vector pNHL19.1, pNHL19.2, pNHL19.3, pNHL20.1, pNHL20.2 và pNHL20.3 được nuôi trong 5 mL môi trường YEP lỏng (1% tryptone, 1% dịch chiết nấm men, 0,5% NaCl) có bổ sung kháng sinh thích hợp với thời gian, nhiệt độ và tốc độ vòng lắc tùy thuộc vào từng chủng vi khuẩn.

Sinh khối ba chủng vi khuẩn được thu nhận bằng cách ly tâm 6.000 vòng/phút trong 1 phút, tái huyền phù trong 1 mL môi trường YEP lỏng trước khi trộn đều với nhau. Hỗn hợp sinh khối sau đó được đồng nuôi cấy, để các vi khuẩn tiến hành tiếp hợp, trên môi trường YEP rắn ở 28°C trong tối 2 ngày. Các khuẩn lạc trên đĩa tiếp hợp được tái huyền phù trong 4 mL môi trường YEP. Lấy 100 µL dịch huyền phù vi khuẩn ở độ pha loãng 10^{-4} trải lên môi trường YEP rắn có bổ sung 50 µg/mL kanamycin và 100 µg/mL spectinomycin và nuôi ở 28°C trong tối 2 ngày. Các khuẩn lạc vi khuẩn *A. tumefaciens* mang vector biểu hiện thực vật trên môi trường YEP có 2 loại kháng sinh được thu hồi để nuôi cấy tăng sinh trên 5 mL của cùng môi trường ở dạng lỏng trong cùng điều kiện. Sinh khối vi khuẩn được dùng để tách chiết DNA plasmid bằng phương pháp ly giải kiềm [100] và sau đó kiểm tra sự hiện diện của các gen chitinase 42 kDa bằng khuếch đại PCR và phản ứng cắt hạn chế.

2.2.6.1. Khuếch đại PCR

Thành phần PCR như sau: DNA plasmid 50 ng, mỗi mỗi loại 10 pmol (Bảng 2.1), dNTP mix 0,2 mM, 10x Dream Taq buffer 2 µL, Dream Taq DNA polymerase 0,5 U, bổ sung nước cất đến thể tích 20 µL. Điều kiện PCR: biến tính plasmid 95°C/10 phút; 30 chu kỳ: 95°C/30 giây, 55°C/45 giây và 72°C/1 phút 30 giây; cuối cùng 72°C/7 phút.

Bảng 2.1. Trình tự nucleotide của các mồi đặc hiệu của các gen chitinase

Tên mồi	Trình tự nucleotide 5'-3'	Kích thước sản phẩm PCR (kb)
Chi42-F	GCGCTCTAGAAAACTAAAAGTAGAAG	~ 1,3
Chi42-R	GCGCGAGCTCTTAGTTGAGACCGCTT	
syncodChi42-F	GCGCTCTAGAAAACTAAAAGTAGAAG	
syncodChi42-R	GCGCGAGCTCTTAATTCAAACCAGAT	

Chú thích: 2 gen *syncodChi42-1* và *syncodChi42-2* có trình tự nucleotide ở các vùng gắn mồi giống nhau, vì vậy chúng được dùng chung một cặp mồi syncodChi42-F và syncodChi42-R. 2 trình tự TCTAGA và GAGCTC lần lượt là các vị trí nhận biết của *XbaI* và *SacI*.

2.2.6.2. Phản ứng cắt hạn chế

Thành phần phản ứng cắt bằng 2 enzyme *SacI* (Thermo Scientific) và *XbaI* (BioLabs) như sau: DNA plasmid 100 ng, 10x Tango buffer 2 μ L, *SacI* 1 U, *XbaI* 2 U, bổ sung nước cất vô trùng đến thể tích 20 μ L. Hỗn hợp phản ứng được ủ ở 37°C trong 2 giờ, sau đó được phân tích bằng điện di trên gel agarose 0,8%.

2.2.7. Chuyển gen chitinase bằng kỹ thuật thẩm nhập

Cây *N. benthamiana* được sinh trưởng trong phòng nuôi ở nhiệt độ 24°C, cường độ ánh sáng 3.000 lux với 12 giờ chiếu sáng/ngày được sử dụng để biểu hiện tạm thời các gen chitinase 42 kDa bằng kỹ thuật thẩm nhập thông qua *Agrobacterium* (agroinfiltration).

Vi khuẩn *A. tumefaciens* LBA4404 mang các vector pNHL19.1, pNHL19.2 và pNHL19.3, và vi khuẩn *A. tumefaciens* LBA4404 mang vector pMYV508 được nuôi cấy riêng rẽ trong 5 mL môi trường YEP [178] có bổ sung 50 μ g/mL kanamycin và 100 μ g/mL spectinomycin trong 2 ngày ở 28°C trong tối với tốc độ lắc 200 vòng/phút. Sinh khối vi khuẩn được thu nhận bằng ly tâm ở tốc độ 6000 vòng/phút trong 5 phút.

Hỗn hợp sinh khối hỗn hợp của 2 chủng *A. tumefaciens* (một chủng mang 1 trong 3 vector biểu hiện thực vật và chủng kia mang vector pMYV508) được pha loãng để đạt OD₆₀₀ từ 0,8-1 bằng đệm MES (10 mM 2-[N-morpholino] ethanesulfonic acid, 10 mM MgSO₄, pH 5,5). Bổ sung 200 μ M acetosyringone giúp tăng khả năng biến nạp của *A. tumefaciens*. Hỗn hợp được ủ trong tối 1-2 giờ. Dịch huyền phù vi khuẩn sau đó sẽ được tiêm vào mặt dưới của lá cây *N. benthamiana* 6 tuần tuổi bằng syringe loại 1 mL không có kim tiêm. Sau 3, 5 và 7 ngày xâm nhiễm, lá được sử dụng để phân tích sự biểu hiện tạm thời của enzyme Ta-CHI42. Vi khuẩn *A. tumefaciens* mang vector pMYV719 được sử dụng làm đối chứng âm.

2.2.8. Biến nạp gen chitinase thông qua *Agrobacterium*

Các chủng *A. tumefaciens* riêng rẽ mang một trong các vector của nhóm pNHL19 hoặc pNHL20 được nuôi trên môi trường YEP lỏng chứa kanamycin 100 μ g/mL và rifampicin 100 μ g/mL ở 28°C trong tối 2 ngày để thu sinh khối. Sau đó, dịch huyền phù của vi khuẩn được pha loãng bằng môi trường ½ MS lỏng để đạt OD₆₀₀ từ 0,9-1,2, tiếp theo bổ sung 200 μ g/mL acetosyringone và ủ trong 1 giờ thỉnh thoảng có lắc nhẹ.

Lá mầm khử phơi, lá mầm chứa phơi và mắt lá mầm của cây lạc được tiên nuôi cấy 3 ngày trước khi ngâm trong các dịch huyền phù *Agrobacterium* riêng rẽ mang các vector biểu hiện thực vật khác nhau có chứa gen chitinase 42 kDa để lây nhiễm trong điều kiện tối 20 phút, thỉnh thoảng lắc nhẹ. Sau khi lây nhiễm, mẫu vật được nuôi trên

môi trường tái sinh chồi (SR), bao gồm môi trường MS cơ bản có sucrose 3% và agar 0,8%, bổ sung acetosyringone 200 µg/mL, BAP 15 mg/L (đối với lá mầm khử phôi) hoặc BAP 15 mg/L và 2,4-D 2 mg/L (đối với lá mầm chứa phôi) hoặc BAP 2 mg/L và NAA 0,1 mg/L (đối với mắt lá mầm) ở 25±2°C, 3 ngày trong tối. Sau đó, mẫu vật được rửa 10 phút trong môi trường SR lỏng có bổ sung 250 µg/mL cefotaxime để loại bỏ *Agrobacterium* và nuôi cấy trên môi trường chọn lọc, bao gồm môi trường SR có bổ sung cefotaxim 100 µg/mL, kanamycin 250 µg/mL ở 25±2°C, cường độ chiếu sáng 2000-3000 lux với 16 giờ chiếu sáng/ngày trong 4 tuần.

Các chồi *in vitro* tái sinh trên môi trường chọn lọc được chuyển sang môi trường MS cơ bản có sucrose 3% và agar 0,8%, bổ sung IAA 0,1 mg/L, BAP 2 mg/L và kanamycin 100 µg/mL trong 4 tuần để nhân chồi. Các chồi riêng lẻ sau đó được tách ra và chuyển vào môi trường MS có sucrose 3% và agar 0,8%, bổ sung BAP 0,45 mg/L để kéo dài chồi. Sau 4-5 tuần các chồi này (cao khoảng 2-3 cm) được chuyển sang môi trường tạo rễ RM, bao gồm MS cơ bản có sucrose 3%, agar 0,8% và bổ sung NAA 0,5 mg/L.

2.2.9. Nhận dạng và phân tích biểu hiện của gen chuyển

2.2.9.1. Khuếch đại PCR

DNA tổng số từ mẫu lá của cây *N. benthamiana* hoặc mẫu rễ của các cây lạc chuyển gen *in vitro* được tách chiết bằng phương pháp CTAB [26]. Khuếch đại PCR được thực hiện với các cặp mồi đặc hiệu cho đoạn chỉ thị của 3 gen chitinase (Bảng 2.2). Thành phần PCR gồm có 20 ng DNA tổng số, 10 pmol mỗi mồi, 1 µL PCR Master Mix (Thermo Scientific), bổ sung nước cất đến thể tích 12 µL. PCR được thực hiện với các chu kỳ nhiệt như sau: biến tính bộ gen ở 95°C/15 phút; 30 chu kỳ tiếp theo: 95°C/1 phút, 55°C/1 phút và 72°C/1 phút; hoàn chỉnh sản phẩm PCR ở 72°C/10 phút.

Bảng 2.2. Trình tự nucleotide của các mồi đặc hiệu cho đoạn chỉ thị của các gen chitinase.

Gen	Mồi	Trình tự nucleotide 5' - 3'	Kích thước sản phẩm PCR (bp)
<i>Chi42</i>	F	TGGTACTATGCAGCTTGACCT	505
	R	GTACTCCCAGTCGACGTC	
<i>syncodChi42-1</i>	F	TGGTACTATGCAGCTTGACCT	689
	R	CGTAATCCAAGACTTGACCCAG	
<i>syncodChi42-2</i>	F	TGGTACTATGCAGCTTGACCT	931
	R	AGAACCGGAACCAATACCATT	

2.2.9.2. Phân tích SDS-PAGE và Western blot

Nghiền 0,5 g mẫu lá của cây *N. benthamiana* hoặc mẫu rễ của các cây lạc chuyển gen *in vitro* trong nitrogen lỏng. Protein hòa tan tổng số được chiết bằng 1 mL đệm PBS (pH 7). Dịch chiết được ly tâm 2 lần ở 13.000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C. Thể nổi sau đó được dùng để định lượng protein bằng phương pháp Bradford (1976) [55].

Điện di SDS-PAGE (12%) và Western blot về cơ bản được thực hiện tương tự như ở mục 2.2.3.2 và mục 2.2.3.3. Cường độ của tín hiệu Western blot được đo bằng phần mềm ImageJ (V 1.52v).

2.2.9.3. Hoạt tính của chitinase thực vật

Hoạt tính thủy phân chitin và hoạt độ chitinase của protein hòa tan tổng số (có chứa Ta-CHI42 thực vật) được tách chiết từ lá của cây *N. benthamiana* hoặc rễ của các cây lạc chuyển gen chitinase 42 kDa được phân tích như ở mục 2.2.4.1.

2.2.10. Thử nghiệm hoạt tính kháng nấm của chitinase thực vật

2.2.10.1. Thử nghiệm *in vitro*

- Cây *N. benthamiana*: 10-60 U/mL Ta-CHI42 từ dịch chiết của lá cây được cho vào môi trường 1/2 PDA rắn trên đĩa Petri và lỏng chứa khoảng 10^4 bào tử nấm *S. rolfii* để đánh giá khả năng ức chế sinh trưởng của nấm. Nuôi cấy được tiến hành ở 28°C trong 36 giờ. Sau khi ly tâm ở 4.000 vòng/phút trong 5 phút, sinh khối sợi nấm từ môi trường nuôi cấy lỏng được rửa sạch với nước cất để xác định khối lượng tươi, tiếp theo là sấy khô đến khối lượng không đổi ở 65°C để xác định khối lượng khô.

- Cây lạc: Rễ của các cây lạc chuyển gen *in vitro* 4 tuần tuổi được cấy lên môi trường 1/2 PDA có chứa 10^4 bào tử nấm *S. rolfii* và ủ ở 28°C trong 96 giờ để đánh giá hoạt tính kháng nấm của chúng dựa trên ức chế sự phát triển của sợi nấm. 20 μ L (10 U/mL) chitinase 42 kDa tinh sạch từ vi khuẩn *E. coli* (mục 2.2.3.2) được sử dụng làm đối chứng dương, nước cất vô trùng và rễ lạc không chuyển gen được sử dụng làm đối chứng âm.

2.2.10.2. Thử nghiệm *in vivo*

Cây lạc chuyển gen *in vitro* 4 tuần tuổi (cao 6-8 cm với 3-4 lá kép và rễ dài 4-5 cm) được trồng trong chậu nhựa với hỗn hợp mùn, cát và vermiculite (1:1:1) đã được khử trùng và đặt trong nhà lưới khoảng 20 ngày cho đến khi lá mới xuất hiện. Sau đó, các cây lạc khỏe mạnh được chọn để chuyển vào chậu mới bao gồm đất phù sa và cát

đã khử trùng (8:2) trong 15-20 ngày cho đến khi xuất hiện thêm 4-5 lá mới để kiểm tra khả năng kháng *S. rolfsii*.

Các kỹ thuật gây nhiễm nấm được tiến hành theo Shokes và cs (1996) với một số cải tiến nhỏ [244]. Nấm *S. rolfsii* được nuôi cấy trên đĩa Petri chứa môi trường PDA trong 3 ngày, sau đó một miếng thạch có đường kính 1 cm chứa nấm từ đĩa nuôi cấy được đặt vào đất ở độ sâu 1 cm và cách gốc lạc 1 cm. Cây lạc được che phủ bằng nylon đục lỗ trong 48 giờ để ngăn thoát hơi nước và duy trì độ ẩm cao để thúc đẩy sự phát triển của nấm. Nhiệt độ trong ngày của tháng 4 năm 2022 dao động chủ yếu trong khoảng 21-35°C. Bệnh héo rũ gốc mốc trắng do nấm *S. rolfsii* gây ra trên cây lạc được đánh giá theo thang điểm 1-5 sau 2 tuần lây nhiễm nấm. Theo đó, 1: cây khỏe mạnh, 2: các vết bệnh chỉ trên thân cây, 3: 25% cây có triệu chứng bệnh (héo, chết hoặc sắp chết), 4: 26-50% cây có triệu chứng bệnh và 5: $\geq 50\%$ cây có triệu chứng bệnh. *S. rolfsii* được phân lập hai lần từ cây chết để đảm bảo rằng đó chính xác là mầm bệnh [207].

2.2.11. Đặc điểm sinh lý và hóa sinh của cây lạc chuyển gen *in vivo*

2.2.11.1. Chọn giá thể thích hợp

Các cây lạc chuyển gen chitinase *in vitro* 8-10 tuần tuổi cao khoảng 6-8 cm có 3-4 lá kép và rễ dài 3-4 cm được chuyển ra khỏi phòng nuôi để ở nơi có ánh sáng tự nhiên, nhiệt độ bình thường khoảng 2 ngày. Sau đó, lấy cây ra khỏi bình, rửa sạch lớp thạch bám xung quanh rễ, cắt ngắn rễ chừa lại khoảng 2 cm và xử lý rễ trong dung dịch diệt nấm Benlat C 0,1% 5 phút. Cây sau đó được trồng trên 6 loại giá thể khác nhau là vụn xơ dừa, đất mùn, đất mùn phối trộn xơ dừa (1:1), đất mùn phối trộn cát và vermiculite (1:1:1), đất mùn phối trộn trấu hun và cát (5:3:2) và đất mùn phối trộn trấu hun (7:3). Mỗi công thức trồng 15 cây, sau 20 ngày trồng và chăm sóc tiến hành thu thập số liệu. Chỉ tiêu theo dõi là chiều cao cây (cm), số lá/cây và tỷ lệ cây sống (%).

2.2.11.2. Đặc điểm sinh lý

2.2.11.2.1. Bố trí thí nghiệm

Trồng trong nhà lưới 16 dòng lạc chuyển gen chitinase 42 kDa có hoạt tính chitinase cao và kháng nấm trong điều kiện *in vitro* mạnh. Đối chứng 1 (NC1) là cây lạc không chuyển gen được nảy mầm từ hạt và đối chứng 2 (NC2) là cây lạc không chuyển gen nuôi cấy *in vitro*. Thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên. Cây sau khi sinh trưởng ổn định trên giá thể thích hợp và bắt đầu ra lá mới sẽ được chuyển sang chậu (30x35 cm). Đất trồng trong chậu (6,5 kg/chậu) là lớp đất phù sa có trồng lạc vụ trước được phơi khô trộn với phân hữu cơ Growel 3-3-3 (Công ty Behn

Meyer Agricare VN). Điều kiện nhà lưới: nhiệt độ trung bình $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ và độ ẩm khoảng 80%.

2.2.11.2.2. Sinh trưởng của cây lạc

- Thời gian sinh trưởng (ngày) của lạc được tính từ khi trồng trên đất đến khi 50% số cây/ô xuất hiện 5 lá thật (ngày xuất hiện 5 lá thật), 50% số cây xuất hiện cành cấp 1 và 50% số cây có ít nhất 1 hoa nở ở bất kỳ đốt nào trên thân chính, tổng thời gian sinh trưởng được tính từ khi chuyển cây ra môi trường đất đến khi khoảng 80-85% số quả có gân điển hình, mặt trong vỏ quả có màu đen, vỏ lụa hạt có màu đặc trưng của giống, tầng lá giữa và gốc chuyển màu vàng và rụng [8].

- Các chỉ tiêu sinh trưởng được quan sát và đo đếm như mô tả của Grodzinxki và Grodzinxki [109]. Mỗi chỉ tiêu được tiến hành trên 15 cá thể, bao gồm:

Chiều cao thân chính (cm): Đo bằng thước từ vị trí phân cành cấp 1 đầu tiên đến đỉnh sinh trưởng của thân chính. Đo định kỳ 10 ngày 1 lần, tính từ khi cây ra lá thật đến khi thu hoạch. (Sử dụng loại thước đo 50 cm, chia độ dài chính xác đến mm).

Tổng số lá/thân: Đếm số lượng lá/thân tại 3 thời điểm (bắt đầu ra hoa, đâm tia làm quả và thu hoạch).

Số lá xanh còn lại/thân chính khi thu hoạch (lá/cây): đếm tổng số lá kếp còn xanh trên cây vào giai đoạn thu hoạch.

Tổng số cành/cây: Đếm số lượng cành/cây tại 3 thời điểm (bắt đầu ra hoa, đâm tia làm quả và thu hoạch).

2.2.11.2.3. Cường độ thoát hơi nước

Cường độ thoát hơi nước được đo theo phương pháp cân nhanh của Ivanov và cs (2012). Cường độ thoát hơi nước của lạc được xác định ở 3 thời điểm: 5 lá thật (20 ngày sau trồng), ra hoa rộ (55 ngày sau trồng) và quả vào chắt (70 ngày sau trồng) [126].

2.2.11.2.4. Hàm lượng chlorophyll

Hàm lượng chlorophyll (Chl) trong lá lạc được xác định ở 3 giai đoạn: 5 lá thật (20 ngày sau khi trồng), ra hoa rộ (55 ngày sau khi trồng) và quả vào chắt (70 ngày sau khi trồng) bằng phương pháp quang phổ theo Arnon [35]. 10 mg lá lạc (lá thứ 3 từ trên xuống) được nghiền với 0,5 mL acetone 100%, dịch chiết sau đó được bổ sung acetone 80% đến 1 mL. Ly tâm dịch chiết ở 12.000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C , thu dịch nổi và pha loãng thành 2 mL với acetone 80%. Độ hấp thụ quang của dịch chiết sau cùng được đo ở bước sóng 645 và 663 nm. Hàm lượng Chl được tính theo công thức:

$$\text{Chl(a)} \text{ (mg/g)} = (12,7 \times A_{663} - 2,69 \times A_{645}) \times V/Fw$$

$$\text{Chl(b)} \text{ (mg/g)} = (22,9 \times A_{645} - 4,68 \times A_{663}) \times V/Fw$$

Trong đó, V: thể tích dịch chiết, Fw: khối lượng tươi của lá, A: độ hấp thụ quang.

2.2.11.2.5. Năng suất và các yếu tố cấu thành năng suất

- *Tổng số hoa/cây*: Theo dõi hàng ngày từ khi ra hoa cho đến khi số hoa bình quân/cây/ngày nhỏ hơn 1 và không tăng liên tục trong ba ngày.

- *Tỷ lệ hoa hữu hiệu (HHH)* được tính theo công thức:

$$\text{HHH}(\%) = (\text{Số quả chắc/cây} \times 100) / \text{tổng số hoa/cây}$$

- *Số quả chắc/cây*: Theo dõi 10 cây/1 ô thí nghiệm. Đếm số quả chắc trên từng cây.

- *Khối lượng 100 quả (g)*: Cân ngẫu nhiên 100 g quả khô, đếm số quả và quy ra khối lượng 100 quả. Lấy 5 mẫu/1 ô thí nghiệm để tính giá trị trung bình.

- *Khối lượng 100 hạt (g)*: Lấy ngẫu nhiên và cân 5 mẫu/1 ô thí nghiệm, 100 quả khô/mẫu. Bóc vỏ, lấy nhân và tiến hành cân để xác định khối lượng nhân.

2.2.11.3. Đặc điểm hóa sinh

2.2.11.3.1. Hàm lượng protein

Nghiền trong nitrogen lỏng 2 g hạt lạc khô và chiết bằng 10 mL đệm phosphate (pH 7). Hỗn hợp được ly tâm ở 13.000 vòng/phút trong 15 phút ở 4°C, dịch nổi được kết tủa với acetone 70% sau đó ly tâm ở 10.000 vòng/phút trong 5 phút ở 4°C. Hòa tan kết tủa trong đệm phosphate (pH 7). Hàm lượng protein được xác định theo phương pháp Bradford [55] bằng cách đo hấp thụ quang của dịch chiết ở bước sóng 595 nm và tính toán hàm lượng protein theo đường chuẩn albumin huyết thanh bò.

2.2.11.3.2. Hàm lượng lipid

Lipid từ hạt lạc được chiết xuất bằng bộ Soxhlet như mô tả của Grassby và cs [107]. 2 g bột lạc khô được chiết xuất với 100 mL petroleum ether qua đêm. Sau đó, dung môi được loại bỏ bằng thiết bị cô quay bay hơi. Cặn lipid trong bình được thu hồi sau khi làm khô ở 105°C trong 2 giờ. Hàm lượng lipid (%) được tính theo công thức sau [98]:

$$\text{Lipid}(\%) = \frac{a - b}{a} \times 100$$

Trong đó, a: khối lượng mẫu trước khi chiết (g), b: khối lượng mẫu sau khi chiết (g).

2.2.11.3.3. Hàm lượng đường khử

Hàm lượng đường khử được đo theo phương pháp của Miller (1959) bằng cách sử dụng thuốc thử 3,5- dinitrosalicylic acid (DNS) [173]. 1 g bột lạc khô được phân tán trong 10 mL nước cất. Hỗn hợp được đun sôi trong 10 phút, sau đó để nguội và ly

tâm ở tốc độ 10.000 vòng/phút trong 5 phút ở nhiệt độ phòng. Thu hồi dịch nổi để xác định hàm lượng đường khử theo các bước sau: 0,1 mL dịch nổi được thêm vào 0,9 mL nước cất, sau đó trộn với 3 mL DNS và đun sôi trong 10 phút. Độ hấp thụ quang của dung dịch sau phản ứng được xác định ở bước sóng 550 nm và hàm lượng đường khử được tính toán dựa trên đường chuẩn của glucose.

2.2.12. Xử lý thống kê

Ngoại trừ các thí nghiệm sinh học phân tử, các thí nghiệm còn lại được lặp lại 3 lần ($n \geq 30$). Số liệu được xử lý One-way ANOVA thông qua Duncan's test với p ở 0,05 bằng chương trình SPSS để so sánh sự sai khác có ý nghĩa thống kê của các giá trị trung bình trong tập hợp mẫu thực nghiệm.

2.3. THỜI GIAN VÀ ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU

Các thí nghiệm của luận án được thực hiện tại Phòng thí nghiệm Bộ môn Công nghệ sinh học, Viện nghiên cứu Hoạt chất sinh học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế trong thời gian từ năm 2019-2022.

CHƯƠNG 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. HOÀN THIỆN HỆ THỐNG TÁI SINH *IN VITRO* Ở CÂY LẠC

Một trong những công việc quan trọng nhất để thực hiện thành công các nghiên cứu chuyển gen là tái sinh cây *in vitro*, tỷ lệ tái sinh càng cao thì hiệu quả chuyển gen càng lớn. Trong nuôi cấy *in vitro* nói chung và cây lạc nói riêng, có nhiều yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả tái sinh. Giống lạc L14 được sử dụng làm nguồn mẫu vật trong nghiên cứu này để khảo sát các yếu tố ảnh hưởng đến khả năng tái sinh *in vitro* của chúng.

3.1.1. Ảnh hưởng của điều kiện khử trùng đến khả năng nảy mầm *in vitro* của hạt

Hạt lạc chứa rất nhiều dầu, là điều kiện lý tưởng cho các loại vi khuẩn và nấm mốc phát triển, vì vậy việc lựa chọn ra một phương thức khử trùng thích hợp là cần thiết để chuẩn bị mẫu cho các nuôi cấy *in vitro* sau này.

Hạt lạc sau khi rửa sạch, được xử lý với các chất khử trùng khác nhau trong các khoảng thời gian khác nhau. Kết quả nghiên cứu sau 10 ngày được trình bày ở bảng 3.1.

Bảng 3.1. Ảnh hưởng của điều kiện khử trùng đến khả năng nảy mầm của hạt lạc.

Chất khử trùng	Nồng độ (%)	Thời gian (phút)	Tỷ lệ mẫu nhiễm (%)	Tỷ lệ mẫu chết (%)	Tỷ lệ mẫu nảy mầm (%)	Ngày nhú mầm	Ngày lên cây hoàn toàn
HgCl ₂	0,1	5	11,25	13,75	75,00	5	10
		10	5,00	22,50	72,50	6	10
		15	1,25	52,50	46,25	6	10
	0,2	5	3,75	71,25	25,00	6	12
		10	0	85,00	15,00	7	15
		15	0	91,25	8,75	7	15
NaOCl	60	5	25,00	10,00	75,00	4	8
		10	18,75	12,5	68,75	4	10
		15	11,25	25	63,75	4	12
	65	5	6,25	22,5	71,25	3	7
		10	1,25	17,5	81,25	3	8
		15	0	50,00	50,00	4	10
AgNO ₃	0,1	5	3,75	23,75	72,50	3	8
		10	2,50	37,50	60,00	4	10
		15	1,25	62,50	36,25	4	10

Kết quả ở bảng 3.1 cho thấy khi tăng thời gian khử trùng thì tỷ lệ hạt chết tăng còn tỷ lệ hạt nhiễm giảm. Thời gian và nồng độ xử lý thích hợp nhất cho từng chất khử trùng lần lượt là: NaOCl 65% trong 10 phút cho tỷ lệ nảy mầm cao nhất 81,25%, tiếp đến là HgCl₂ 0,1% trong 5 phút cho tỷ lệ nảy mầm đạt 75%, và AgNO₃ 0,1% trong 5 phút có 72,5% tỷ lệ hạt nảy mầm. Ngoài ra, khi khử trùng với NaOCl 65% trong 10 phút tỷ lệ hạt nhiễm cũng thấp chỉ 1,25%. Đồng thời NaOCl ít gây độc cho cây cũng như cho người sử dụng so với hai chất khử trùng còn lại. Vì vậy, NaOCl 65% xử lý trong 10 phút đã được chọn để sử dụng trong nghiên cứu này.

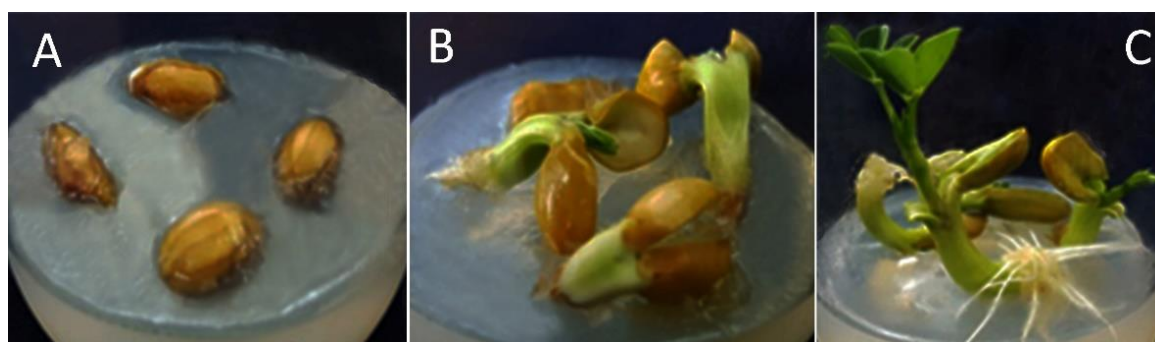
3.1.2. Ảnh hưởng của phương thức nảy mầm

Kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của phương thức nảy mầm được trình bày ở bảng 3.2 và hình 3.1.

Bảng 3.2. Ảnh hưởng của phương thức nảy mầm hạt lạc.

Phương thức	Số lượng mẫu cây	Ngày nhú mầm	Ngày lên cây	Tỷ lệ lên cây sau 10 ngày (%)
Để nguyên hạt còn vỏ lụa	80	10	18	12,5
Để nguyên hạt và bóc vỏ lụa	80	7	12	57,5
Bóc vỏ lụa và tách đôi hạt	80	3	8	77,5

Số liệu ở bảng 3.2 cho thấy khi để nguyên hạt còn vỏ lụa (Hình 3.1A) hoặc để nguyên hạt và bóc vỏ lụa (Hình 3.1B) thì thời gian nhú mầm và lên cây rất lâu tương ứng phải sau 7-10 ngày và 12-18 ngày, trong khi nếu tách đôi hạt lạc và cấy úp phần hạt có chứa phôi lên môi trường (Hình 3.1C) thì chỉ sau 3 ngày hạt đã nhú mầm và sau 8 ngày đã lên cây. Do đó, phương thức bóc vỏ lụa và tách đôi hạt của giống lạc L14 đã được sử dụng trong nghiên cứu này.



Hình 3.1. Hạt lạc sau 10 ngày gieo theo các phương thức khác nhau. A: để nguyên hạt còn vỏ lụa, B: bóc vỏ lụa nhưng để nguyên hạt; C: bóc vỏ lụa và tách đôi hạt.

3.1.3. Khả năng tái sinh chồi từ các bộ phận khác nhau của cây lạc *in vitro*

Nghiên cứu tái sinh *in vitro* cây lạc thường được tiến hành trên lá mầm [200], mắt lá mầm [148], phôi trực và lá non [167] thông qua phương thức tái sinh trực tiếp do có lợi thế là nhanh chóng hình thành phôi hoặc chồi và không yêu cầu phải cấy chuyên thường xuyên. Hệ thống tái sinh trực tiếp này được ưu tiên vì khả năng tiếp cận dễ dàng và thuận lợi cho việc chuyển gen qua trung gian *A. tumefaciens*.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy hơn 81% cây lạc giống L14 đã nảy mầm trên môi trường MS sau 3 ngày nuôi cấy (Hình 3.2A) và đến ngày thứ 7 đã phát triển thành cây *in vitro* hoàn chỉnh. Cây con được cắt thành các mẫu cấy khác nhau bao gồm chồi đỉnh, trụ trên lá mầm, trụ dưới lá mầm và mắt lá mầm để khảo sát sự tái sinh chồi trên các môi trường nuôi cấy khác nhau (Hình 3.3). Kết quả quan sát cho thấy môi trường MS bổ sung BAP 4 mg/L và NAA 0,1 mg/L là thích hợp nhất. Số lượng chồi tái sinh từ trụ trên lá mầm là 2,3 chồi/mẫu cao hơn các loại mẫu cấy còn lại chỉ 1-1,8 chồi/mẫu, tuy nhiên tỷ lệ mẫu tái sinh chỉ khoảng 50%. Sau 4 tuần, chồi chính phát triển mạnh, khỏe, phân nhánh nhiều, có nhiều chồi mầm nhỏ li ti. Các chồi đỉnh cho tỷ lệ tái sinh cao nhất với 95% và khả năng tạo cụm chồi là chỉ 1,6 chồi/mẫu (Bảng 3.3). Trong các nghiên cứu tiếp theo, chúng tôi đã chọn trụ trên lá mầm để làm nguyên liệu tái sinh chồi.

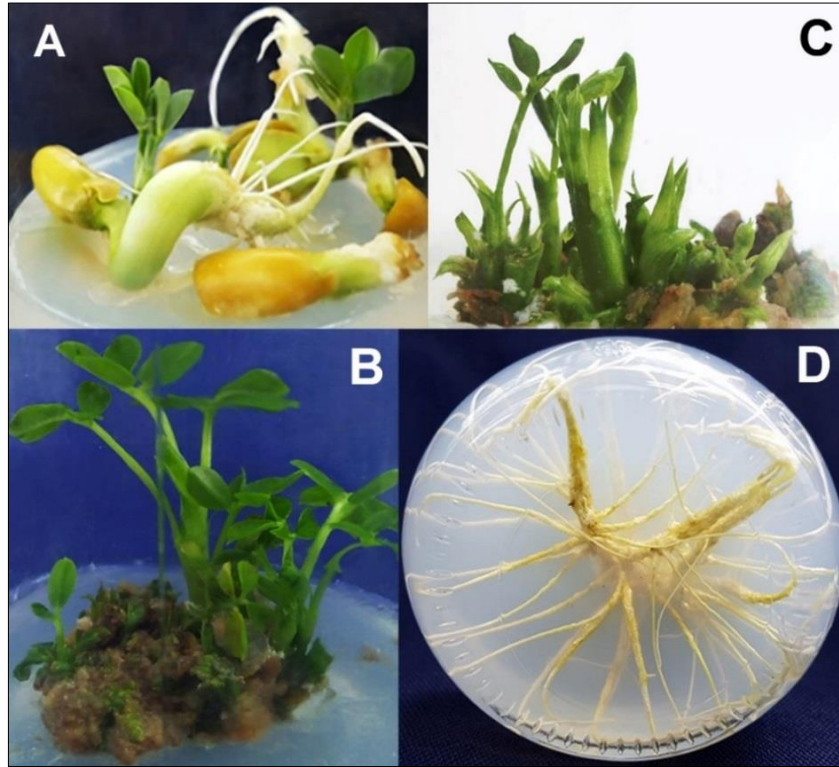
Bảng 3.3. Tái sinh chồi từ các loại mẫu nuôi cấy khác nhau trên môi trường MS bổ sung BAP 4 mg/L và NAA 0,1 mg/L.

Mẫu cấy	Tỷ lệ tái sinh (%)	Số chồi trên mẫu	Chiều dài chồi (cm)
Chồi đỉnh	95	1,6 ^b	3,1 ^b
Trụ trên lá mầm	50	2,3 ^a	2,9 ^b
Trụ dưới lá mầm	40	1,8 ^b	2,6 ^b
Mắt lá mầm	100	1,0 ^b	6,6 ^a

Chú thích: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê (Duncan's test, $p < 0,05$).

Như đã biết, các cytokinin và auxin như BAP, 2-iP, TDZ và NAA thường được sử dụng trong vi nhân giống thực vật. Cytokinin và auxin đóng vai trò quan trọng trong thúc đẩy quá trình phân chia tế bào, cảm ứng và phát triển các trung tâm mô phân sinh để hình thành các cơ quan [209]. Đỉnh sinh trưởng (dài 0,1-1 mm) là phần tận cùng của thân bao gồm mô phân sinh ngọn (0,05-0,1 mm) cùng với các lá nguyên sinh đang phát triển và mô thân liền kề [269]. Do đó, phần lớn nuôi cấy đỉnh sinh

trường về cơ bản là nuôi cấy mô phân sinh đỉnh. Nhiều nghiên cứu cho thấy mẫu cây được lấy từ các bộ phận đang phát triển mạnh của cây như mô phân sinh đỉnh rất thích hợp cho việc nhân chồi. Và sự kết hợp của BAP và NAA theo một tỷ lệ và nồng độ thích hợp sẽ tạo điều kiện cho việc hình thành cụm chồi và kéo dài chồi trên mẫu cây [223].



Hình 3.2. Nuôi cấy *in vitro* cây lạc. A: hạt nảy mầm, B: tạo cụm chồi, C: tái sinh chồi từ lá mầm khử phôi, và D: ra rễ của các chồi riêng lẻ.

3.1.4. Ảnh hưởng của BAP lên tái sinh chồi *in vitro* từ trụ trên lá mầm

Chồi *in vitro* từ trụ trên lá mầm được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung BAP từ 1-5 mg/L. Kết quả cho thấy môi trường có BAP 4 mg/L có số chồi cao nhất với 3,8 chồi/mẫu, tỷ lệ mẫu cây tái sinh là khoảng 40%, khá cao so với các nồng độ BAP khác (Bảng 3.4, Hình 3.2B và Hình 3.3).

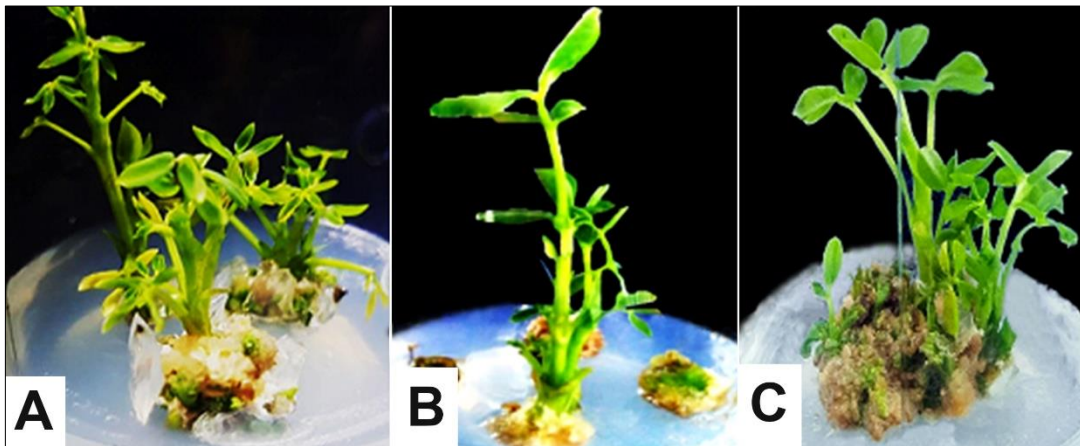
Một số nghiên cứu trước đây cho thấy khả năng tái sinh chồi *in vitro* của cây lạc đã tăng lên ở các nồng độ BAP cao hơn, ví dụ: Môi trường MS chứa BA 33 μ M (hơn 7,4 mg/L) kết hợp với NAA 5,3 μ M và $AgNO_3$ 23,54 μ M cho số chồi trung bình trên mỗi mẫu tái sinh (chồi đỉnh) là 6,3 [198]. Palanivel và cs (2014) đã thu được số chồi cao nhất (hơn 17 chồi) ở giống lạc ICGV00351 (Tamil Nadu, Ấn Độ) trên môi trường chứa BAP 25 mg/L và IAA 0,5 mg/L [201]. Trong một nghiên cứu khác, các mẫu vật khác nhau như phôi hợp tử, đỉnh sinh trưởng và phôi trục của giống lạc NC-7 đã được xử lý trước 15 ngày trên môi trường MS có bổ sung BA 25 mg/L. Quá trình nuôi cấy

tiếp theo đếm được số chồi cao nhất trên mỗi mẫu là từ 2,67-4,43 (phôi hợp tử), 2,33-4,11 (đỉnh sinh trưởng) và 1,87-3,33 (phôi trực) trên môi trường MS có nồng độ BA dao động từ 0,25-3 mg/L sau 8 tuần quan sát [197].

Bảng 3.4. Ảnh hưởng của BAP lên tái sinh chồi của trụ trên lá mầm.

BAP (mg/L)	Tỷ lệ mẫu tái sinh chồi (%)	Số chồi trên mẫu	Chiều dài chồi (cm)
1	18,8	2,6 ^{bc}	2,4 ^{ab}
2	21,9	2,9 ^{ab}	2,6 ^{ab}
3	31,3	3,1 ^{ab}	2,7 ^{ab}
4	40,6	3,8 ^a	3,0 ^a
5	43,8	3,0 ^{ab}	2,9 ^{ab}
Đối chứng	12,5	1,9 ^c	2,3 ^b

Chú thích: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê (Duncan's test, $p < 0,05$). Đối chứng: môi trường không có BAP.



Hình 3.3. Tái sinh chồi từ trụ trên lá mầm (A), trụ dưới lá mầm (B) và mắt lá mầm (C) của cây lạc *in vitro* sau 4 tuần nuôi cấy.

3.1.5. Ảnh hưởng của BAP lên tái sinh chồi *in vitro* từ lá mầm

Để cải thiện tỷ lệ tái sinh chồi, các lá mầm có phôi và lá mầm khử phôi được nuôi cấy trên môi trường MS có bổ sung BAP từ 1-5 mg/L. Số liệu ở bảng 3.5 cho thấy tái sinh chồi của lá mầm khử phôi đạt cao nhất với 6,8 chồi/mẫu (Hình 3.2C) nhưng chỉ 1 chồi/mẫu đối với lá mầm có phôi trên môi trường có bổ sung BAP 4 mg/L. Các nồng độ BAP được thử nghiệm khác cho hiệu quả tái sinh chồi thấp hơn (Số liệu không trình bày).

Nhiều nghiên cứu đã cho rằng lá mầm khử phôi của các loại hạt có dầu (chẳng hạn như lạc) có khả năng tái sinh cao mà không cần qua giai đoạn mô sẹo, vì vậy chúng thường được sử dụng như một loại mẫu vật tiềm năng để nhân chồi [220],

[264]. Nghiên cứu của Tiwari và Tuli (2008) trên 4 giống lạc của Ấn Độ (JL-24, TMV-2, TAG-24 và Dh-3-30) chỉ ra rằng các mầm chồi bất định có thể được tạo ra từ các mẫu lá mầm khử phôi nuôi cấy trên môi trường chứa BAP 5 mg/L và 2,4-D 2 mg/L trong 4 tuần, hoặc trên môi trường chỉ chứa 20 mg/L BAP trong 2 tuần đầu tiên, sau đó ở môi trường chứa BAP 15 mg/L trong 2 tuần tiếp theo [264]. Kết quả từ các nghiên cứu này đã củng cố cho các kết quả trong luận án của chúng tôi.

Bảng 3.5. Tái sinh chồi từ lá mầm trên môi trường MS chứa 4 mg/L BAP.

Mẫu cấy	Tỷ lệ tái sinh chồi (%)	Số chồi trên mẫu	Chiều dài chồi (cm)
Lá mầm khử phôi	23,3	6,8 ^a	4,1 ^b
Lá mầm có phôi	86,7	1,0 ^b	5,9 ^a

Chú thích: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê (Duncan's test, $p < 0,05$).

Tuy nhiên, Radhakrishnan và cs (2000) đã thu được tỷ lệ tái sinh chồi khá thấp 57,9% từ các lá mầm đã khử phôi ở giống lạc J11 trên môi trường chứa BAP 15 mg/L. Trong khi phôi trực và toàn bộ hạt trưởng thành có thể đạt hiệu quả tái sinh cao hơn tương ứng là 100% và 86% trên môi trường được bổ sung BAP lần lượt là 30 mg/L và 50 mg/L [220]. Một nghiên cứu tương tự với sự cảm ứng cụm chồi ở 2 giống lạc, VRI-2 và VRI-3 từ Tamil Nadu (Ấn Độ), Palanivel và Jayabalan (2002) đã phát hiện thấy lá mầm có phôi hoàn toàn đã tạo được nhiều chồi hơn ở cả 2 giống. Các mẫu lá mầm khử phôi hoàn toàn và lá mầm khử phôi một phần cho thấy phản ứng kém hơn. Trong các nồng độ của BAP kết hợp với NAA 0,5 mg/L, BAP 25 mg/L được xem là tốt nhất, cho số chồi trung bình cao nhất và thời gian cảm ứng tạo chồi ngắn nhất [200]. Nói chung, khả năng cảm ứng tạo chồi của lá mầm khử phôi cũng như các loại mẫu vật khác, rất khác nhau tùy thuộc vào giống lạc. Số lượng chồi được tạo ra trên mỗi mẫu thay đổi tùy theo nồng độ của các chất kích thích sinh trưởng được bổ sung vào môi trường.

3.1.6. Ảnh hưởng của NAA và IBA lên khả năng tạo rễ của chồi *in vitro*

Chồi *in vitro* của cây lạc được chuyển lên môi trường MS có chứa NAA và IBA để cảm ứng tạo rễ. Kết quả ở bảng 3.6 cho thấy tất cả các nồng độ thử nghiệm của 2 chất này đều kích thích ra rễ ở chồi *in vitro*. Tuy nhiên, NAA cho hiệu quả cao hơn IBA, số lượng rễ cao nhất là 10,9 ở nồng độ 0,5 mg/L với tỷ lệ tạo rễ 100% và rễ hình thành sớm hơn, chỉ sau 9-12 ngày nuôi cấy (Hình 3.2D). Trong khi trên môi trường chứa IBA, các chồi *in vitro* có số lượng rễ ít hơn và rễ hình thành muộn hơn, từ ngày thứ 15-18 (Số liệu không trình bày).

Bảng 3.6. Ảnh hưởng của NAA và IBA đến khả năng tạo rễ của chồi *in vitro*.

Chất KTST (mg/L)	Tỷ lệ chồi tạo rễ (%)	Số rễ trên chồi	Chiều dài rễ (cm)
NAA	0,1	75,0	4,3 ^b
	0,3	87,5	4,4 ^b
	0,5	100	10,9 ^a
IBA	0,1	75,0	3,4 ^b
	0,3	62,5	2,6 ^c
	0,5	50,0	1,9 ^c
Đối chứng	0,0	50,0	1,5 ^c

Chú thích: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê (Duncan's test, $p < 0,05$).

Ảnh hưởng của các auxin (chẳng hạn NAA, IBA hoặc IAA) đến ra rễ và sinh trưởng của cây, đã được thảo luận trong một số nghiên cứu trước đây, tùy thuộc vào sự cảm ứng của các loại mẫu hoặc các loài khác nhau với môi trường dinh dưỡng. Tuy nhiên, trong một số trường hợp, NAA kích thích tạo rễ tốt hơn IBA. Ví dụ, Limbua và cs (2019) đã phát hiện NAA là chất KTST thích hợp cho các giống lạc CGV 12991, CG 7 và Red Valencia, và nếu sử dụng ở nồng độ 1 mg/L có thể thu được số lượng cây có rễ nhiều nhất [154]. Một số nghiên cứu trước đây ở các giống cây khác cũng cho kết quả tương tự, ví dụ: tái sinh rễ *in vitro* ở mía [128] hoặc cây dừa cảnh (*Neoregelia concentrica*) [170]. Ngược lại, giống lạc ICGV-00351 chỉ cho khả năng tái sinh rễ cao, tối đa 25 rễ/lá mầm có phôi, chỉ khi được nuôi cấy trên môi trường có IBA 5 mg/L [201]. Các chồi *in vitro* của cây bạch đàn lai *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla* cũng có phản ứng tốt với IBA để tạo rễ [73]. Trong khi đó, môi trường có chứa IAA cho khả năng tạo rễ *in vitro* tốt nhất ở chồi táo giống 'Jork 9' [84].

Tóm lại, nghiên cứu của chúng tôi cho thấy lá mầm khử phôi của giống lạc L14 là loại mẫu cây thích hợp và cho hiệu quả cao trong việc tạo cụm chồi *in vitro* trên môi trường MS bổ sung BAP 4 mg/L. Các chồi *in vitro* riêng lẻ ra rễ mạnh nhất trên môi trường MS có NAA 0,5 mg/L.

3.2. SẢN XUẤT KHÁNG THỂ ĐA DÒNG KHÁNG CHITINASE Ở CHUỘT

3.2.1. Tổng hợp các gen chitinase

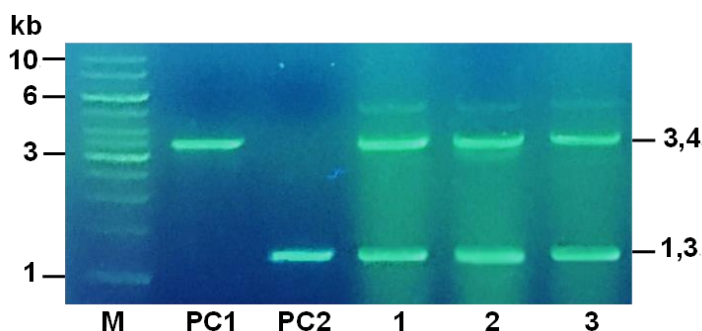
Các gen mã hóa chitinase 42 kDa bao gồm *Chi42* là gen hoang dại từ *T. asperellum* SH16 đã được loại bỏ các đoạn intron, *syncodChi42-1* và *syncodChi42-2* là

hai gen đã được tối ưu hóa codon cho biểu hiện ở thực vật đã được đăng ký trên GenBank với mã số lần lượt là MT083802.1, MT083803.1. Các gen chitinase 42 kDa này đã được tổng hợp và tạo dòng trong vector pUC19 và biến nạp vào tế bào *E. coli* TOP10.

Thế biến nạp *E. coli* mang các vector pUC19/chitinase 42 kDa tái tổ hợp được nuôi cấy tăng sinh trong môi trường LB lỏng có bổ sung 50 µg/mL Amp để tách chiết DNA plasmid. Kết quả kiểm tra bằng cách giải trình tự các gen *Chi42*, *syncodChi42-1* và *syncodChi42-2* từ vector pUC19 cho thấy chúng tương đồng hoàn toàn với các trình tự lý thuyết đã được tối ưu.

3.2.2. Tạo dòng các gen chitinase trong vector biểu hiện *E. coli* pQE30

Vector pQE30 và các vector tái tổ hợp pUC19/*Chi42*, pUC19/*syncodChi42-1* và pUC19/*syncodChi42-2* đã được cắt hạn chế bằng *Bam*HI và *Sac*I. Các gen *Chi42*, *syncodChi42-1*, *syncodChi42-2* và vector pQE30 đã mở vòng sau đó được tinh sạch bằng GeneJET Gel Extraction Kit để làm vật liệu cho việc tạo thành các vector tái tổ hợp pQE30/*Chi42*, pQE30/*syncodChi42-1* và pQE30/*syncodChi42-2*. Các vector này đã được cắt hạn chế cũng bằng 2 enzyme kể trên để kiểm tra sự chèn đoạn thành công của 3 gen chitinase. Kết quả điện di trên gel agarose 0,8% cho thấy ở cả 3 vector đều xuất hiện 2 băng DNA có kích thước khoảng 3,4 kb và 1,3 kb phù hợp với kích thước của vector pQE30 (~3,4 kb) và 3 gen chitinase (~1,3 kb) (Hình 3.4).



Hình 3.4. Cắt hạn chế vector pQE30 tái tổ hợp mang các gen chitinase 42 kDa bằng *Bam*HI và *Sac*I. M: thang chuẩn DNA 1 kb (Thermo Fisher Scientific); PC1: vector pQE30; PC2: gen *syncodChi42-2* từ vector pUC19/*syncodChi42-2* đã được tinh sạch; 1: *Chi42*, 2: *syncodChi42-1*, và 3: *syncodChi42-2*.

3.2.3. Biểu hiện các gen chitinase trong *E. coli*

Các tế bào *E. coli* được biến nạp vector pQE30 mang các gen chitinase 42 kDa đã biểu hiện thành công chitinase 42 kDa (Ta-CHI42) khi được cảm ứng với IPTG. Phân tích SDS-PAGE cho thấy cả 3 gen *Chi42*, *syncodChi42-1* và *syncodChi42-2*

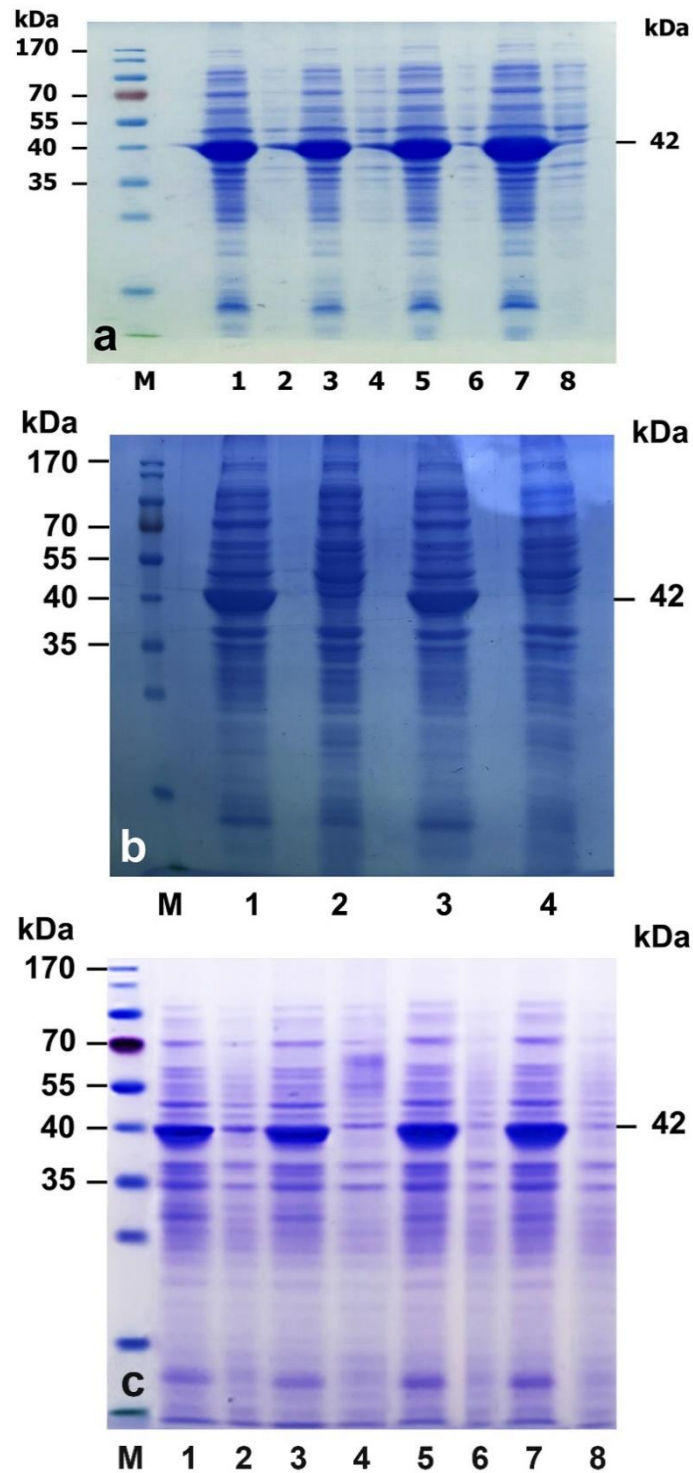
được sinh tổng hợp mạnh trong các tế bào *E. coli*. Các protein được dự đoán là enzyme Ta-CHI42 có khối lượng phân tử khoảng 42 kDa như tính toán (Hình 3.5a, b và c). Do các enzyme Ta-CHI42 của 3 gen *Chi42*, *syncodChi42-1* và *syncodChi42-2* có cùng trình tự amino acid nên chúng tôi chỉ chọn sản phẩm dịch mã của gen *syncodChi42-1* để tinh sạch và sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.2.4. Sản xuất kháng thể đa dòng kháng Ta-CHI42

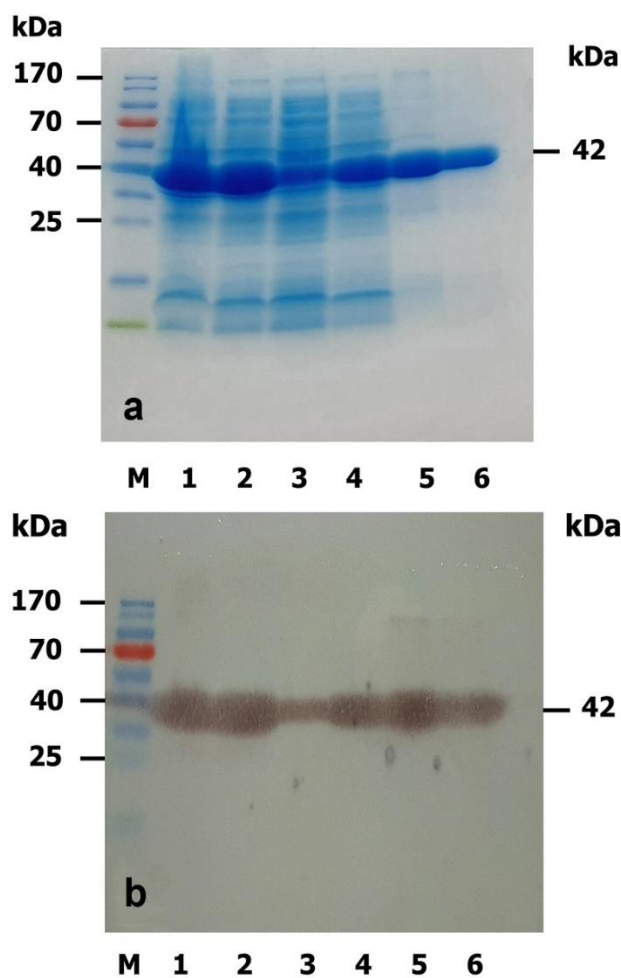
Độ tinh sạch của Ta-CHI42 thu hồi từ sắc ký ái lực đã được kiểm tra bằng SDS-PAGE. Kết quả trình bày ở hình 3.6a cho thấy phân đoạn rửa giải cuối cùng (đường số 6) chỉ có một băng protein rất mạnh với khối lượng phân tử khoảng 42 kDa. Nồng độ Ta-CHI42 tinh sạch thu được theo tính toán khoảng 4 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Sau khi được thẩm tách với đệm PBS (pH 7,4), nồng độ cuối cùng của enzyme xấp xỉ 1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

Ta-CHI42 tinh sạch sau đó được trộn với tá dược hoàn chỉnh của Freund để nhũ tương hoàn toàn và tiêm vào chuột Balb/c. Để tăng cường miễn dịch, Ta-CHI42 được trộn với tá dược không hoàn chỉnh Freund và được tiêm vào chuột sau lần tiêm đầu tiên 4 tuần. Kháng thể được thu vào ngày thứ 5 hoặc thứ 6 sau khi tiêm lần đầu tiên và lần thứ hai. Các kháng thể thu được từ lần tiêm thứ hai cho thấy hiệu quả cao hơn lần tiêm đầu tiên (Số liệu không trình bày). Phân tích phản ứng miễn dịch ở chuột bằng Western blot cho thấy kháng thể đa dòng kháng Ta-CHI42 đã được sản xuất rất nhiều ở chuột. Một tín hiệu duy nhất về sự tương tác giữa protein kháng nguyên (Ta-CHI42) và kháng thể đa dòng kháng chitinase xuất hiện ở vị trí khoảng 42 kDa như mong đợi (Hình 3.6b). Kháng thể này sẽ được sử dụng để phân tích sự biểu hiện của các gen chitinase 42 kDa ở cây chuyển gen trong các nghiên cứu tiếp theo.

Trong nghiên cứu này, các gen chitinase từ *T. asperellum* SH16 đã biểu hiện mạnh trong các tế bào *E. coli* M15 nhờ vector pQE30. Nhiều gen từ các sinh vật khác cũng có mức độ biểu hiện tương tự ở *E. coli* với hệ thống vector trên, ví dụ gen chitinase từ *Sulfolobus tokodaii* [254] hoặc gen chitinase (*OsCLP*) từ *Oryza sativa* [288]. Hệ thống vector pQE30 đã được sử dụng rộng rãi để biểu hiện các loại protein khác nhau trong tế bào *E. coli*. Ưu điểm biểu hiện mạnh protein của vector pQE30 là nhờ sử dụng promoter T5, promoter này đã được tối ưu hóa với phần operator bao gồm hai chuỗi operator *lac*, cùng với hệ thống tinh sạch 6 \times His có đặc tính liên kết và rửa giải hiệu quả, ít ảnh hưởng đến hoạt động của các protein tái tổ hợp. Ở pH 8, hệ thống tinh sạch này không sinh miễn dịch, do đó thường không ảnh hưởng đến sự gấp nếp của protein (QIAexpressionist Kit 2003, Hilden).



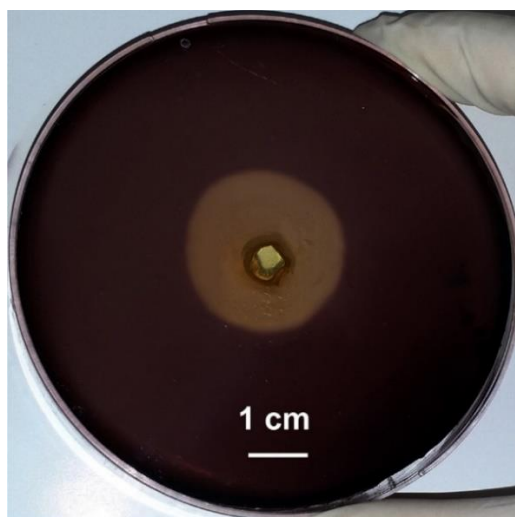
Hình 3.5. SDS-PAGE của protein hòa tan tổng số từ tế bào *E. coli* M15 được biến nạp vector pQE30 mang các gen *syncodChi42-1* (a), *syncodChi42-2* (b) và *Chi42* (c). M: thang chuẩn khối lượng protein (10-170 kDa, Thermo Fisher Scientific). 1-3-5-7 (a và c) và 1-3 (b): tế bào *E. coli* được cảm ứng với 0,5 mM IPTG ở 37°C trong 4 giờ. 2-4-6-8 (a và c) và 2-4 (b): tế bào *E. coli* không cảm ứng IPTG làm đối chứng.



Hình 3.6. SDS-PAGE (a) và Western blot (b) của enzyme Ta-CHI42 được tinh sạch. M: thang chuẩn khối lượng protein (10-170 kDa, Thermo Fisher Scientific). 1: protein tổng số, 2: protein tổng số hòa tan (dịch chiết enzyme thô), 3: enzyme thô qua cột, 4: rửa cột, 5 và 6: 2 phân đoạn rửa giải enzyme.

3.2.5. Hoạt tính thủy phân chitin của Ta-CHI42

Hoạt tính thủy phân colloidal chitin của Ta-CHI42 tinh sạch trên đĩa thạch được trình bày ở hình 3.7. Hiệu số $D-d$ khá cao xấp xỉ 2,5 cm, trong đó D là đường kính vòng phân giải và d là đường kính của lỗ đục để nạp enzyme. Kết quả này cho thấy Ta-CHI42 đã được biểu hiện ở dạng hoạt động với hoạt tính cao trong tế bào *E. coli*. Một số nghiên cứu trước đây cũng có kết quả tương tự như Paulsen và cs (2016) đã tìm thấy vòng phân giải trên đĩa thạch colloidal chitin khi nuôi cấy vi khuẩn *E. coli* chứa gen *ChiA*, một chitinase của *Pseudoalteromonas piscicida* S2040 [208]. Li và cs (2018) cũng phát hiện sự thủy phân chitin của enzyme ChiKJ406136 tái tổ hợp của *Streptomyces sampsonii* KJ40 trên cơ chất colloidal chitin [153].



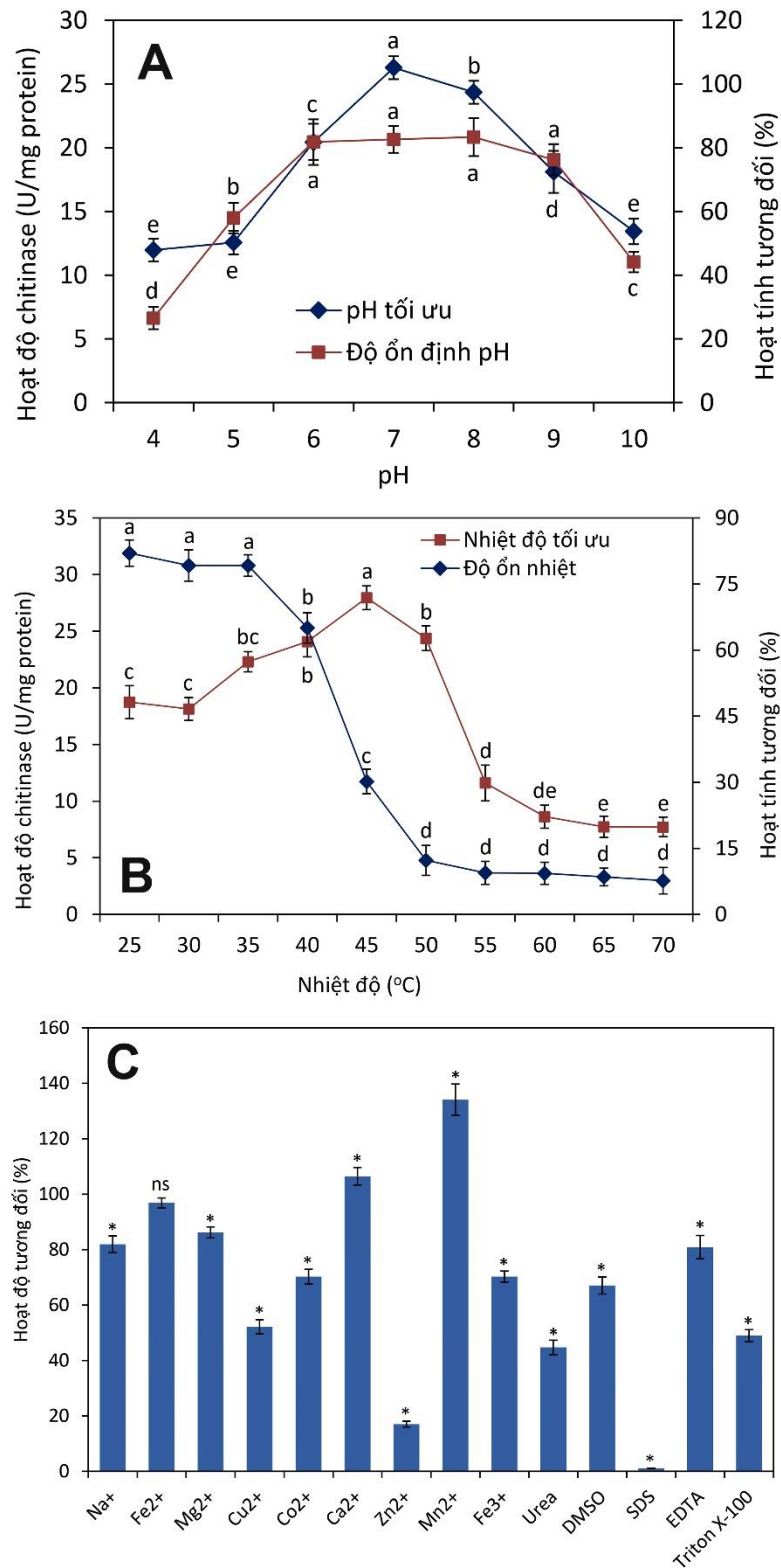
Hình 3.7. Hoạt tính thủy phân chitin của enzyme Ta-CHI42 tinh sạch được biểu thị với một vùng phân giải trên đĩa 1,5% agar có cơ chất là 1,2% colloidal chitin.

3.2.6. Đặc điểm của enzyme Ta-CHI42

Như đã biết, một phân tử enzyme sẽ kết hợp hoàn hảo với cơ chất đặc hiệu của nó. Vì vậy, nếu một enzyme bị biến tính, nó sẽ không hoạt động nữa. Những thay đổi quá lớn về nhiệt độ hoặc độ pH có thể gây biến tính enzyme. Do đó, việc xác định nhiệt độ và pH tối ưu của một loại enzyme là vô cùng cần thiết cho các ứng dụng của nó trong tương lai.

Nghiên cứu này nhận thấy enzyme Ta-CHI42 tinh sạch đạt được hoạt độ cao nhất, xấp xỉ 26 U/mg protein ở pH 7 và hoạt độ đáng kể được quan sát thấy ở pH 6-8 (20-26 U/mg protein). pH ổn định của Ta-CHI42 cũng được duy trì trong phạm vi từ 6-8 với hoạt độ tương đối hơn 80% (Hình 3.8A). Tương tự như Ta-CHI42, chitinase từ *Streptomyces chilikensis* RC1830 và chitinase CHI6769 từ *Saccharothrix yanglingensis* Hhs.015 cũng có pH tối ưu là 7 [162], [224]. Tuy nhiên, enzyme đầu khá ổn định ở vùng pH từ acid đến kiềm nhẹ (5-8), trong khi enzyme sau chỉ ổn định trong phạm vi pH từ acid đến trung tính (4-7).

Nhiệt độ tối ưu và độ bền nhiệt của Ta-CHI42 tinh sạch được xác định ở pH 7. Số liệu từ hình 3.8B cho thấy enzyme này đã thể hiện hoạt tính thủy phân chitin cao nhất ở 45°C với hơn 28 U/mg protein và hoạt tính cao của enzyme cũng được tìm thấy ở 40 và 50°C (khoảng 24 U/mg protein). Kết quả nghiên cứu về độ bền nhiệt cho thấy enzyme ổn định ở 25-35°C (hoạt độ tương đối khoảng 80%) và giảm nhanh chóng ở nhiệt độ >40°C. Chu kỳ bán rã ước tính ($t_{1/2}$) của Ta-CHI42 là khoảng 47 phút ở 40°C.



Hình 3.8. Đặc điểm của enzyme Ta-CHI42 tinh sạch. (A) pH tối ưu và giới hạn pH của Ta-CHI42. (B): Nhiệt độ tối ưu và độ bền nhiệt của Ta-CHI42. (C): Ảnh hưởng của một số ion kim loại ở nồng độ 5 mM và các thuốc thử khác nhau như SDS 1%, EDTA 1 mM, urea 1 M, DMSO 5% và Triton X-100 1% lên hoạt tính của Ta-CHI42. Các chữ cái khác nhau trên cùng một đường biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê (Duncan's test, $p < 0,05$). ns: sai khác không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$) so với đối chứng (100%), *: sai khác có ý nghĩa thống kê ($p < 0,05$) so với đối chứng (100%).

Nhìn chung, nhiệt độ tối ưu và độ bền nhiệt của chitinase ở các sinh vật khác nhau rất phong phú. Không giống như Ta-CHI42, chitinase từ *Bacillus* sp. 7079 có nhiệt độ tối ưu cao hơn lên đến 55°C và độ bền nhiệt trong phạm vi 10-50°C [151]. Trong khi đó, chitinase từ *Serratia marcescens* B4A có cùng mức nhiệt độ tối ưu như Ta-CHI42 đều ở 45°C, nhưng độ bền nhiệt của nó dao động từ 10 đến 50°C [296]. Một nghiên cứu của Ekundayo và cs (2016) cũng nhận thấy rằng chitinase từ *T. viride* đạt hoạt tính cực đại ở 50°C và có độ bền nhiệt từ 40-50°C [91].

Tóm lại, Ta-CHI42 là một chitinase trung tính (pH tối ưu là 7) với nhiệt độ tối ưu tương đối cao là 45°C. Như đã biết, thay đổi pH và nhiệt độ bên ngoài giá trị thích hợp nhất cho các enzyme sẽ làm chậm hoặc thậm chí dừng phản ứng xúc tác của chúng. Do đó, việc xác định pH và nhiệt độ tối ưu của các enzyme là rất cần thiết cho các ứng dụng trong các quy trình quan trọng về mặt thương mại.

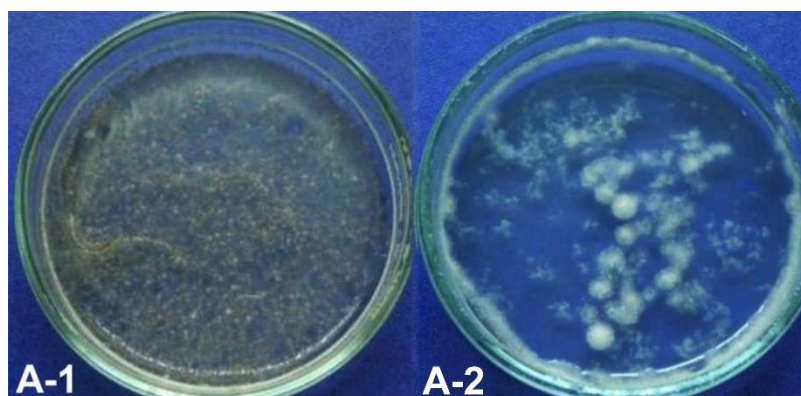
Nhiều nghiên cứu đã xác định được một số ion kim loại hoạt động như các cofactor để nâng cao hiệu quả xúc tác của các enzyme trong phản ứng thủy phân [224]. Tuy nhiên, tác dụng của các ion kim loại trên các enzyme khác nhau cũng rất đa dạng. Chúng có thể hoạt hóa hoặc ức chế hoạt động xúc tác của các enzyme bằng cách tương tác với nhóm amine hoặc carboxyl của amino acid, do đó sẽ làm tăng hoặc giảm lượng sản phẩm tạo ra từ phản ứng [125]. Trong nghiên cứu này, một số ion kim loại đã được chọn dựa trên các nghiên cứu trước đó nhằm tăng cường tác động lên hoạt tính của các chitinase khác nhau [45], [64], [104], [206], [284]. Tuy nhiên, hoạt tính thủy phân chitin của Ta-CHI42 gần như hoàn toàn bị loại bỏ bởi Zn^{2+} và SDS (tương ứng khoảng 83% và 99%), trong khi đó hoạt tính này vẫn còn khoảng 45-52% dưới tác dụng của urea, Triton X-100 và Cu^{2+} . Ngoại trừ các ion như Mn^{2+} và Ca^{2+} đã tăng cường hoạt tính thủy phân chitin (khoảng 107-134%); các ion như Na^+ , Fe^{2+} , Mg^{2+} và EDTA có ảnh hưởng không đáng kể đến enzyme, hoạt độ tương đối dao động từ 82 đến 97% (Hình 3.8C).

Các ion kim loại có thể tham gia ổn định cấu trúc phân tử protein và hoạt động xúc tác của nhiều enzyme. Tuy nhiên, các ion kim loại nặng (ví dụ: kẽm, đồng, sắt...) thường gây biến tính enzyme [129]. Trong một số trường hợp, hoạt độ của chitinase tăng lên chỉ khi có mặt Ca^{2+} hoặc Mn^{2+} , chẳng hạn Ca^{2+} và Mn^{2+} hoạt hóa chitinase của *Stenotrophomonas rhizophila* G22 [129]. Trong khi đó, Mg^{2+} gây ức chế đáng kể chitinase từ *S. rhizophila* G22 và *Bacillus* sp. R2. Chất tẩy ion (SDS) và chất tẩy không ion (Triton X-100) cũng ảnh hưởng đến hoạt tính của chitinase [129].

Như đã biết, SDS và urea là các chất biến tính nên chúng thường làm bất hoạt enzyme do gây ra sự thay đổi cấu trúc của enzyme. Theo Ekundayo và Bamidele (2016), *Trichoderma* có thể miễn cảm với EDTA, xử lý bằng EDTA đã làm giảm hoạt độ tương đối của chitinase từ *T. viride* [91].

3.2.7. Hoạt tính kháng nấm *in vitro* của Ta-CHI42

Hoạt tính kháng nấm của Ta-CHI42 được trình bày ở hình 3.9 và bảng 3.7. Sinh trưởng của nấm *A. niger* gây bệnh héo rũ mốc đen hại cây trồng, như hành tây [233], đã bị ức chế trên môi trường chứa Ta-CHI42 (Hình 3.9). Số liệu ở bảng 3.7 cũng cho thấy sinh khối của nấm bệnh giảm đáng kể dưới tác dụng của Ta-CHI42, chỉ đạt 57 mg tươi (khoảng 1,63 mg khô) khi được xử lý với 60 U/mL Ta-CHI42. Trong khi ở đối chứng không xử lý Ta-CHI42, sinh khối tươi đạt 924 mg (khoảng 7,23 mg sinh khối khô).



Hình 3.9. Ảnh hưởng của enzyme Ta-CHI42 tinh sạch lên sinh trưởng của *A. niger*. A-1: môi trường không có chitinase làm đối chứng, A-2: môi trường chứa Ta-CHI42.

Bảng 3.7. Ảnh hưởng của enzyme Ta-CHI42 tinh sạch lên sinh khối tươi và khô của sợi nấm *A. niger* sau 48 giờ nuôi cấy.

Ta-CHI42 (U/mL)	Sinh khối tươi (mg)	Sinh khối khô (mg)
10	611 ^b	4,77 ^b
20	366 ^c	4,27 ^{bc}
40	119 ^d	2,43 ^c
60	57 ^e	1,63 ^{cd}
Đối chứng	924 ^a	7,23 ^a

Chú thích: Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê (Duncan's test, $p < 0,05$). Đối chứng: môi trường không có chitinase.

Tương tự như nghiên cứu này, một số chitinase tái tổ hợp biểu hiện ở *E. coli* đã cho thấy hoạt tính kháng nấm của chúng. Chẳng hạn, chitinase 42 kDa (ECH-42) từ *T.*

harzianum kháng lại các nấm bệnh khác nhau như *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, *S. rolfsii*, *Alternaria brassicae* và *Alternaria brassicicola*. Sinh trưởng của sợi nấm bị ức chế ở nồng độ enzyme 200 µg/mL [241]. Chitinase 32 kDa có nguồn gốc từ lúa mạch ở nồng độ 80 và 200 µg ức chế đáng kể các loại nấm gây bệnh ở cây trồng như *Alternaria solani*, *Fusarium* spp., *R. solani* và *Verticillium dahliae* [270]. Các tế bào sợi nấm của *Cylindrocladium scoparium*, *Cryphonectria parasitica*, *Neofusicoccum parvum* và *F. oxysporum* đã bị phá vỡ bởi chitinase 48 kDa (ChiKJ406136) từ *S. sampsonii* [153]. Ngoài ra, chitinase lớp I từ đậu đũa (*Vigna unguiculata*) được biểu hiện ở *P. pastoris* cũng cho thấy khả năng ức chế sự nảy mầm của bào tử và sinh trưởng của sợi nấm *Penicillium herquei* [149]. Những nghiên cứu này chứng minh rằng các gen chitinase của sinh vật nhân thực có thể được biểu hiện trong *E. coli* hoặc nấm men và chúng đã thể hiện hoạt tính kháng nấm cao.

3.3. THIẾT KẾ CÁC CẤU TRÚC BIỂU HIỆN CHITINASE Ở THỰC VẬT

Các gen chitinase 42 kDa bao gồm *Chi42* từ *T. asperellum* SH16 và 2 gen tổng hợp *syncodChi42-1* và *syncodChi42-2* đã tối ưu hóa trình tự được chèn vào vector biểu hiện thực vật pMYV719 dưới sự điều khiển của 2 promoter dp35S hoặc pAsy.

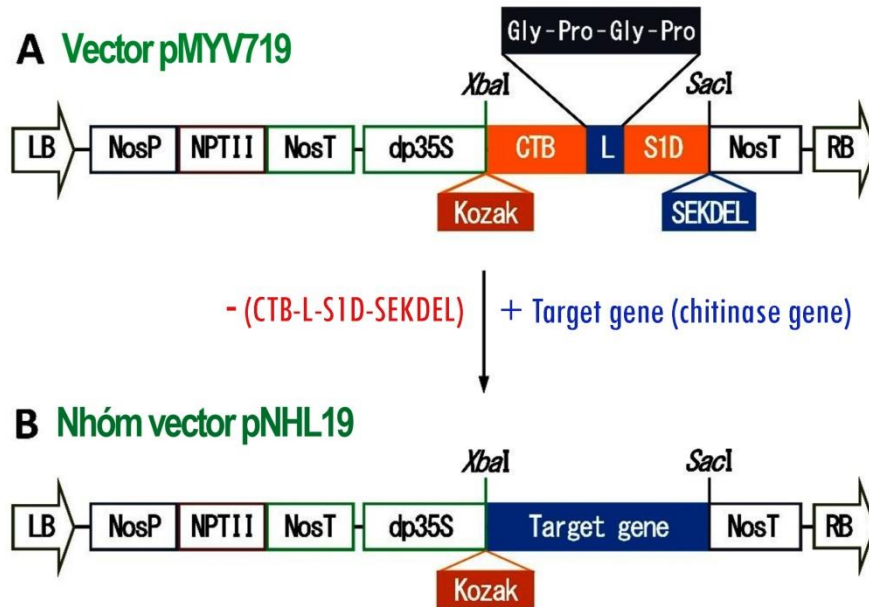
3.3.1. Tạo dòng gen chitinase vào vector pMYV719

Các gen chitinase 42 kDa mang trình tự peptide tín hiệu ở đầu 5' được tách dòng từ các vector pUC19/*Chi42*, pUC19/*syncodChi42-1* và pUC19/*syncodChi42-2* để thay thế trình tự CTB-L-SD1-SEKDEL trong vector pMYV719 (Hình 3.10). Các gen này có chiều dài khoảng 1,3 kb, còn vector pMYV719 sau khi loại bỏ trình tự CTB-L-SD1-SEKDEL có kích thước khoảng 11 kb. Các vector tái tổ hợp mới mang gen chitinase 42 kDa, pNHL19.1 (*Chi42*), pNHL19.2 (*syncodChi42-1*) và pNHL19.3 (*syncodChi42-2*), được kiểm tra bằng khuếch đại PCR và cắt hạn chế.

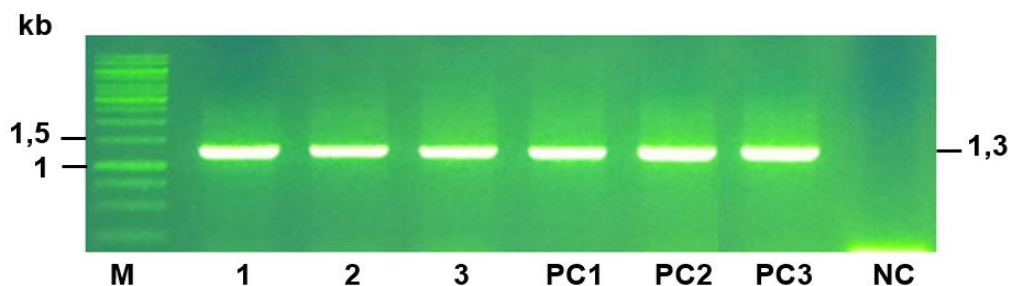
Khuếch đại PCR bằng các cặp mồi đặc hiệu cho thấy cả 3 vector đều có sự hiện diện của các đoạn chèn có kích thước phù hợp với các gen chitinase 42 kDa khoảng 1,3 kb (Hình 3.11). Phản ứng cắt hạn chế được thực hiện với các enzyme *SacI* + *XbaI*, *XbaI*, và *SacI* cũng cho các kết quả như dự đoán, *SacI* + *XbaI* cho 2 băng DNA khoảng 11 kb (pMYV719) và khoảng 1,3 kb (gen chitinase 42 kDa), *XbaI* hoặc *SacI* cho 1 băng DNA khoảng 12,3 kb (pMYV719 + gen chitinase 42 kDa) (Hình 3.12-3.14).

Để biểu hiện thành công một gen ngoại lai trong tế bào thực vật, các gen cần được đặt dưới sự điều khiển của một promoter thích hợp. Trong nghiên cứu này, các

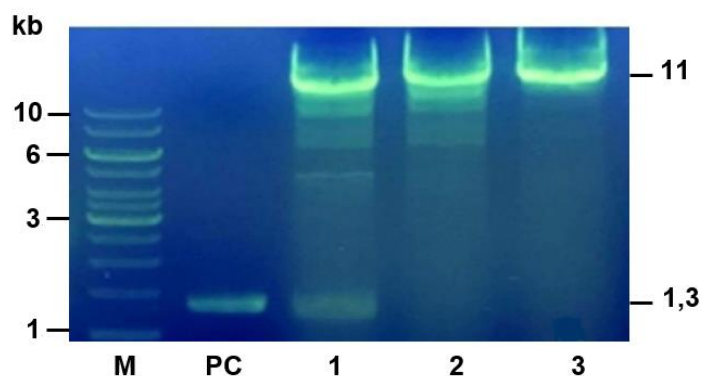
gen mã hóa chitinase 42 kDa được điều khiển bởi promoter CaMV 35S của virus khảm súp lơ, đây là một trong những promoter cấu thành được sử dụng rộng rãi nhất và phù hợp cho nhiều loại vật chủ khác nhau [131], [252]. Promoter CaMV 35S là một trình tự khởi động phiên mã có thể điều khiển sự biểu hiện của các gen ngoại lai trong toàn bộ cơ thể sinh vật [255].



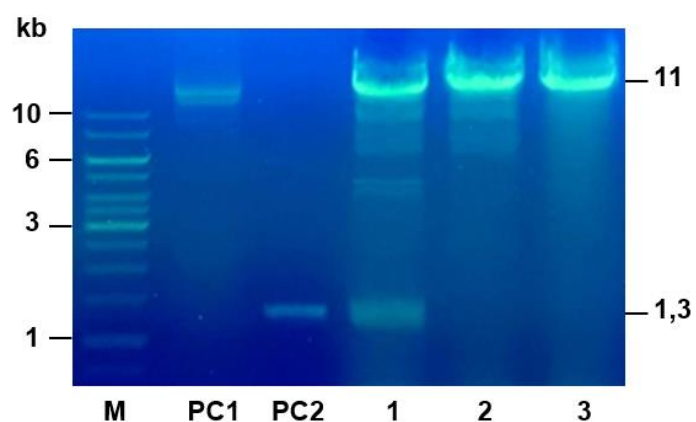
Hình 3.10. Sơ đồ thiết kế vector biểu hiện thực vật nhóm pNHL19. (A) vector pMYV719, (B) nhóm vector pNHL19, LB và RB: biên trái và phải của vùng T-DNA, NosP: promoter của gen nopaline synthase, NPTII: gen neomycin phosphotransferase II kháng kanamycin, NosT: terminator của gen nopaline synthase, Kozak: trình tự liên ứng để ribosome nhận biết và bắt đầu dịch mã, CTB: gen mã hóa tiểu đơn vị B độc tố tả, L: trình tự Gly-Pro-Gly-Pro, S1D: vùng biểu mô S1D, SEKDEL: tín hiệu duy trì trong mạng lưới nội sinh chất, dp35S: duplicated promoter CaMV 35S, và target gene: 1 trong 3 gen *Chi42* (pNHL19.1), *syncodChi42-1* (pNHL19.2) và *syncodChi42-2* (pNHL19.3) bao gồm cả đoạn peptide tín hiệu.



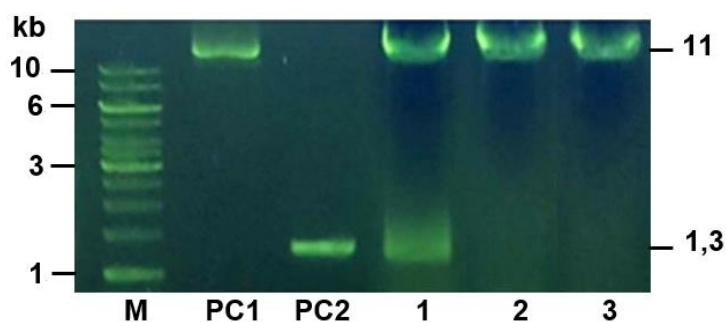
Hình 3.11. Khuếch đại PCR các gen chitinase 42 kDa từ khuẩn lạc *E. coli* với các cặp mồi đặc hiệu. M: thang chuẩn DNA 1 kb (Thermo Scientific), 1: *Chi42*, 2: *syncodChi42-1*, 3: *syncodChi42-2*, PC1: pUC19/*Chi42*, PC2: pUC19/*syncodChi42-1*, PC3: pUC19/*syncodChi42-2*, NC: *E. coli* không biến nạp.



Hình 3.12. Cắt hạn chế vector pNHL19.1 bằng *Xba*I và *Sac*I. M: thang chuẩn DNA 1 kb (Thermo Scientific); 1-3: pMYV719/*Chi*42 được cắt lần lượt bằng *Sac*I và *Xba*I, *Xba*I, *Sac*I; PC: gen *Chi*42 từ pUC19/*Chi*42.



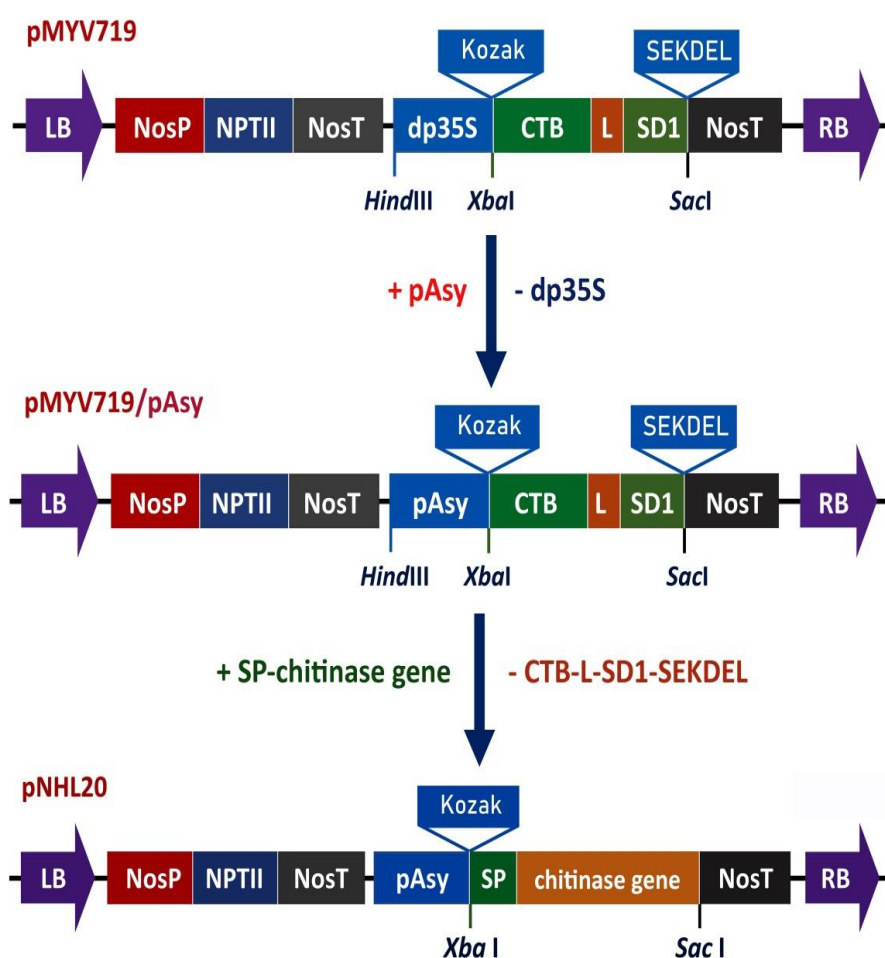
Hình 3.13. Cắt hạn chế vector pNHL19.2 bằng *Xba*I và *Sac*I. M: thang chuẩn DNA 1 kb (Thermo Scientific); 1-3: pMYV719/*syncodChi*42-1 được cắt lần lượt bằng *Sac*I và *Xba*I, *Xba*I, và *Sac*I; PC1: pMYV719 mạch vòng; PC2: gen *syncodChi*42-1 từ pUC19/*syncodChi*42-1.



Hình 3.14. Cắt hạn chế vector pNHL19.3 bằng *Xba*I và *Sac*I. M: thang chuẩn DNA 1 kb (Thermo Scientific); 1-3: pMYV719/*syncodChi*42-2 được cắt lần lượt bằng *Sac*I và *Xba*I, *Xba*I, và *Sac*I; PC1: pMYV719 mạch vòng, PC2: gen *syncodChi*42-2 từ pUC19/*syncodChi*42-2.

3.3.2. Tạo dòng gen chitinase và promoter Asy vào vector pMYV719

Thiết kế vector biểu hiện phù hợp với vật chủ là một trong những yếu tố quan trọng quyết định sự thành công của kỹ thuật tạo cây chuyển gen. Sự biểu hiện của gen chuyển trong thực vật được kiểm soát thông qua hoạt động của promoter và terminator. Hiện nay, để điều khiển hoạt động của gen chuyển ở thực vật, đã có rất nhiều loại promoter được sử dụng. Trong nghiên cứu này, ngoài việc sử dụng promoter dp35S để điều khiển biểu hiện gen chitinase như đã đề cập ở trên, chúng tôi còn sử dụng promoter Asy đặc hiệu rễ để tăng cường sinh tổng hợp enzyme ở bộ phận dễ bị nhiễm nấm bệnh nhất là rễ của cây lạc [102]. Sơ đồ tạo dòng gen chitinase và promoter Asy vào vector biểu hiện thực vật pMYV719 được trình bày ở hình 3.15.



Hình 3.15. Sơ đồ thiết kế nhóm vector biểu hiện thực vật pNHL20. LB và RB: biên trái và phải của vùng T-DNA, NosP: promoter của gen nopaline synthase, NPTII: gen neomycin phosphotransferase II kháng kanamycin, NosT: terminator của gen nopaline synthase, pAsy: promoter Asy đặc hiệu rễ, Kozak: trình tự liên ứng để ribosome nhận biết và bắt đầu dịch mã, CTB: gen mã hóa tiểu đơn vị B độc tố tả, L: trình tự Gly-Pro-Gly-Pro, S1D: vùng biểu mô S1D, SEKDEL: tín hiệu duy trì trong mạng lưới nội sinh chất, dp35S: duplicated promoter CaMV 35S, SP: trình tự peptide tín hiệu, và chitinase gene: 1 trong 3 gen chitinase (*Chi42*, *syncodChi42-1* và *syncodChi42-2*).

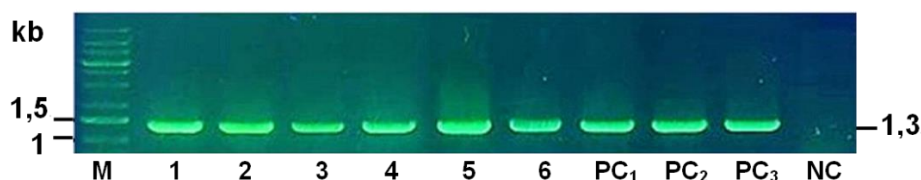
3.3.2.1. Tạo dòng promoter pAsy trong vector pMYV719

Promoter dp35S bị loại khỏi vector pMYV719 bằng *Hind*III và *Xba*I. Promoter Asy được tách dòng từ vector pUC19/pAsy cũng bằng 2 enzyme kể trên. Sau đó, vector pMYV719 không còn promoter dp35S được gắn với promoter Asy để tạo thành vector tái tổ hợp pMYV719/pAsy. Vector mới này đã được kiểm tra bằng phản ứng cắt hạn chế với 2 enzyme cũ để xác nhận sự chèn đoạn thành công của promoter Asy vào vector gốc pMYV719.

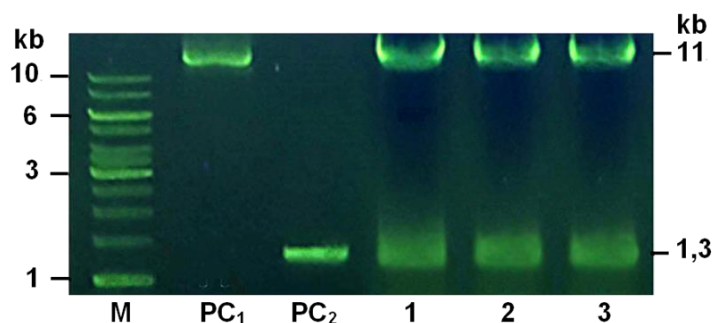
3.3.2.2. Tạo dòng gen chitinase vào vector pMYV719/Asy

Các gen chitinase 42 kDa mang đoạn peptide tín hiệu ở đầu 5' được phân lập từ vector pUC19/chitinase bằng *Xba*I và *Sac*I để thay thế trình tự CTB-L-SD1-SEKDEL trong vector biểu hiện thực vật pMYV719/pAsy tạo thành nhóm vector tái tổ hợp mới pNHL20, bao gồm pNHL20.1 (*Chi*42), pNHL20.2 (*syncodChi*42-1) và pNHL20.2 (*syncodChi*42-2). Sự hiện diện của các gen chitinase trong nhóm vector pNHL20 đã được xác định bằng khuếch đại PCR và phản ứng cắt hạn chế.

Kết quả trình bày ở hình 3.16 cho thấy các sản phẩm PCR đều có kích thước phù hợp với 3 gen chitinase 42 kDa, khoảng 1,3 kDa. Phản ứng cắt hạn chế các vector nhóm pNHL20 đã được thực hiện với 2 enzyme *Xba*I và *Sac*I cũng cho kết quả đúng như tính toán, 1 băng DNA khoảng 11 kb (pMYV719/Asy) và 1 băng DNA khoảng 1,3 kb (gen chitinase 42 kDa) (Hình 3.17).



Hình 3.16. Khuếch đại PCR các gen chitinase từ khuẩn lạc *E. coli* với các cặp mồi đặc hiệu. M: thang chuẩn DNA 1 kb (Thermo Scientific), 1-2: *Chi*42, 3-4: *syncodChi*42-1, 5-6: *syncodChi*42-2, PC1: vector pUC19/*Chi*42, PC2: vector pUC19/*syncodChi*42-1, PC3: vector pUC19/*syncodChi*42-2, NC: *E. coli* không biến nạp.



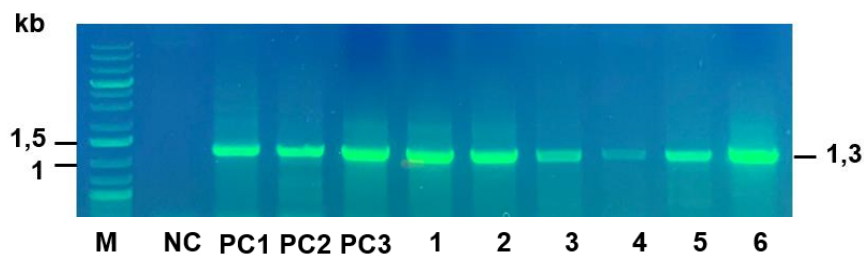
Hình 3.17. Cắt hạn chế các vector pNHL20 bằng *Xba*I và *Sac*I. M: thang chuẩn DNA 1 kb (Thermo Scientific), PC1: pMYV719/Asy, PC2: gen *Chi*42 và 1-3: pNHL20.1 (*Chi*42), pNHL20.2 (*syncodChi*42-1) và pNHL20.3 (*syncodChi*42-2).

Promoter đóng vai trò quan trọng trong quá trình biểu hiện gen để đảm bảo sự hoạt động hiệu quả của gen đích. Khi protein quan tâm không cần thiết để biểu hiện cho toàn bộ cây, việc sử dụng các promoter đặc hiệu cơ quan hoặc mô cụ thể sẽ giúp gen chuyển biểu hiện mạnh hơn ở nơi này. Điều này góp phần giảm sự lãng phí năng lượng và chất dinh dưỡng từ cây chuyển gen [111]. Cây lạc rất dễ nhiễm các loại nấm bệnh từ đất có thành tế bào chứa chitin như *Rhizoctonia*, *Aspergillus* hoặc *Sclerotium* gây thối rễ hoặc thối cổ rễ, vì vậy việc sản xuất chitinase ngoại bào ở rễ là cần thiết để bảo vệ cây lạc chống lại các tác nhân gây bệnh loại này.

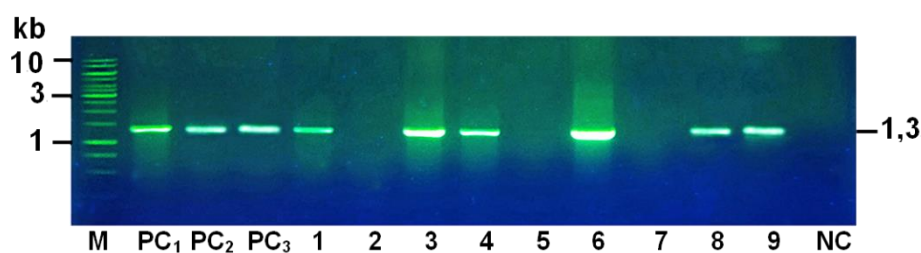
Cho đến nay, chưa có báo cáo nào về việc sử dụng promoter đặc hiệu rễ ở cây lạc, phần lớn các cây chuyển gen đều sử dụng promoter CaMV 35S. Tuy nhiên, việc sử dụng các promoter cấu thành sẽ làm gen đích biểu hiện ở những bộ phận không cần thiết, có khả năng can thiệp vào các con đường sinh trưởng và phát triển khác của thực vật [85]. Do đó, mục tiêu của luận án là tăng cường hiệu quả kháng nấm của cây lạc bằng cách sử dụng promoter đặc hiệu rễ.

3.3.3. Tạo vi khuẩn *A. tumefaciens* LBA4404 mang gen chitinase

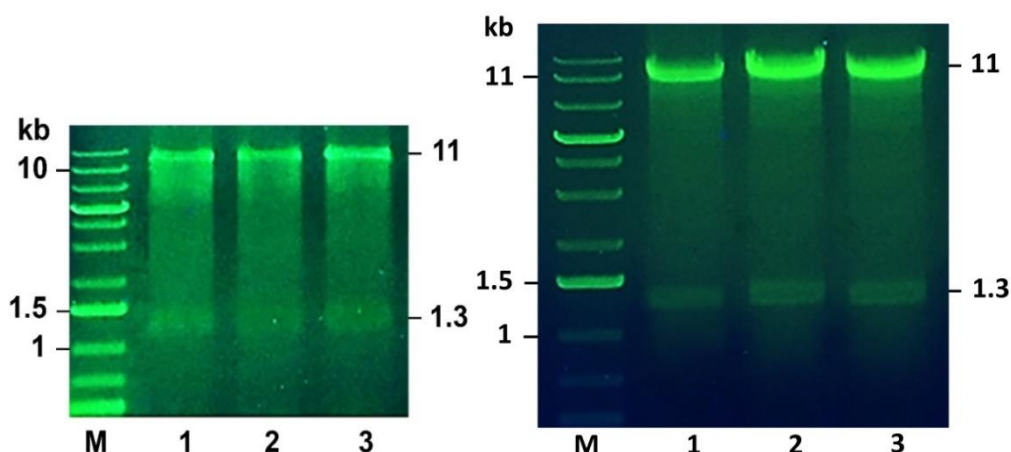
Các vector tái tổ hợp mang các gen chitinase 42 kDa nhóm pNHL19 và pNHL20 được tiếp hợp vào *A. tumefaciens* LBA4404. Sự hiện diện của các vector này trong vi khuẩn *Agrobacterium* đã được kiểm tra bằng khuếch đại PCR các gen chitinase với các cặp mồi đặc hiệu và phản ứng cắt hạn chế. Kết quả trình bày ở hình 3.18 và 3.19 cho thấy các sản phẩm PCR có kích thước phù hợp với các gen chitinase. Các sản phẩm cắt hạn chế bằng *Xba*I và *Sac*I cũng cho kết quả phù hợp, sự xuất hiện 2 băng DNA có kích thước như mong đợi khoảng 11 kb (vector) và 1,3 kb (gen chitinase) (Hình 3.20). Kết quả này cho thấy các vi khuẩn *A. tumefaciens* đã sẵn sàng cho quá trình chuyển gen chitinase vào cây *N. benthamiana* và cây lạc trong các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 3.18. Khuếch đại PCR các gen chitinase ở nhóm vector pNHL19 từ *A. tumefaciens* LBA4404. M: thang chuẩn DNA 1 kb (Thermo Scientific), 1-2: *Chi42*, 3-4: *syncodChi42-1*, 5-6: *syncodChi42-2*, PC1: pUC19/*Chi42*, PC2: pUC19/*syncodChi42-1*, PC3: pUC19/*syncodChi42-2*, NC: *A. tumefaciens* không tiếp hợp.



Hình 3.19. Khuếch đại PCR các gen chitinase ở nhóm vector pNHL20 từ *A. tumefaciens* LBA4404. M: thang chuẩn DNA 1 kb (Thermo Scientific), 1-3: *Chi42*, 4-6: *syncodChi42-1*, 7-9: *syncodChi42-2*, PC1: pUC19/*Chi42*, PC2: pUC19/*syncodChi42-1*, PC3: pUC19/*syncodChi42-2*, NC: *A. tumefaciens* không tiếp hợp.



Hình 3.20. Cắt hạn chế các vector pNHL19 (trái) và vector pNHL20 (phải) bằng *Xba*I và *Sac*I. M: thang chuẩn DNA 1 kb (Thermo Scientific), 1: *Chi42*, 2: *syncodChi42-1*, 3: *syncodChi42-2*. Các gen chitinase dài ~ 1,3 kb, các vector pMYV719 và pNHL20 dài ~ 11 kb.

3.4. BIỂU HIỆN TẠM THỜI GEN CHITINASE TRONG CÂY *N. benthamiana*

3.4.1. Biểu hiện của các gen chitinase

Cây *N. benthamiana* được sử dụng phổ biến để biểu hiện tạm thời gen chuyển nhằm đánh giá hiệu quả của cấu trúc biểu hiện thực vật thông qua kỹ thuật thâm nhập. Ưu điểm của phương thức này là khả năng biểu hiện nhanh và vượt mức (overexpression), không bị ảnh hưởng bởi vị trí gắn gen đích trong tế bào thực vật (hiệu ứng vị trí - position effect) và có thể tiến hành biểu hiện trong các mô đã biệt hóa hoàn toàn như lá [97].

Dịch khuẩn sau khi ly tâm đã được bổ sung acetosyringone. Đây là một hợp chất phenol do tế bào thực vật bị tổn thương tiết ra, có vai trò quan trọng trong việc nhận biết và gắn kết vi khuẩn với tế bào thực vật [99]. Vì vậy, trong các thí nghiệm chuyển gen hay biểu hiện tạm thời sử dụng vi khuẩn *A. tumefaciens*, acetosyringone thường được thêm vào như một chất dẫn dụ vi khuẩn giúp cho vi khuẩn dễ dàng xâm nhiễm vào cây [257].

Vị trí lá trên cây ảnh hưởng đến quá trình biến nạp vector vào lá. Lá cây lúc còn non có khả năng sinh trưởng khỏe và khả năng tổng hợp các chất cao; ngược lại với khả năng sinh trưởng kém của lá già, việc tổng hợp các chất hầu như diễn ra rất chậm. Bên cạnh đó, khả năng xâm nhập của vi khuẩn vào lá non cũng dễ hơn vào lá già. Kết quả nghiên cứu của Nguyễn Thị Minh Hằng và cs (2015) cho thấy, phần mẫu lá non thứ 1 và 2 từ ngọn xuống và những lá chính giữa thân cây tạo điều kiện cho sự xâm nhiễm của vi khuẩn tốt hơn. Hơn nữa, quá trình sinh tổng hợp ở cây luôn diễn ra và đặc biệt, quá trình đó lại tập trung chủ yếu tại cơ quan đang sinh trưởng (lá non và những lá chính giữa thân cây), vì vậy, protein quan tâm cũng được tăng lên theo [5]. Do đó, trong thí nghiệm này chúng tôi đã xâm nhiễm *Agrobacterium* vào vị trí lá non và lá bánh tẻ đang sinh trưởng mạnh.

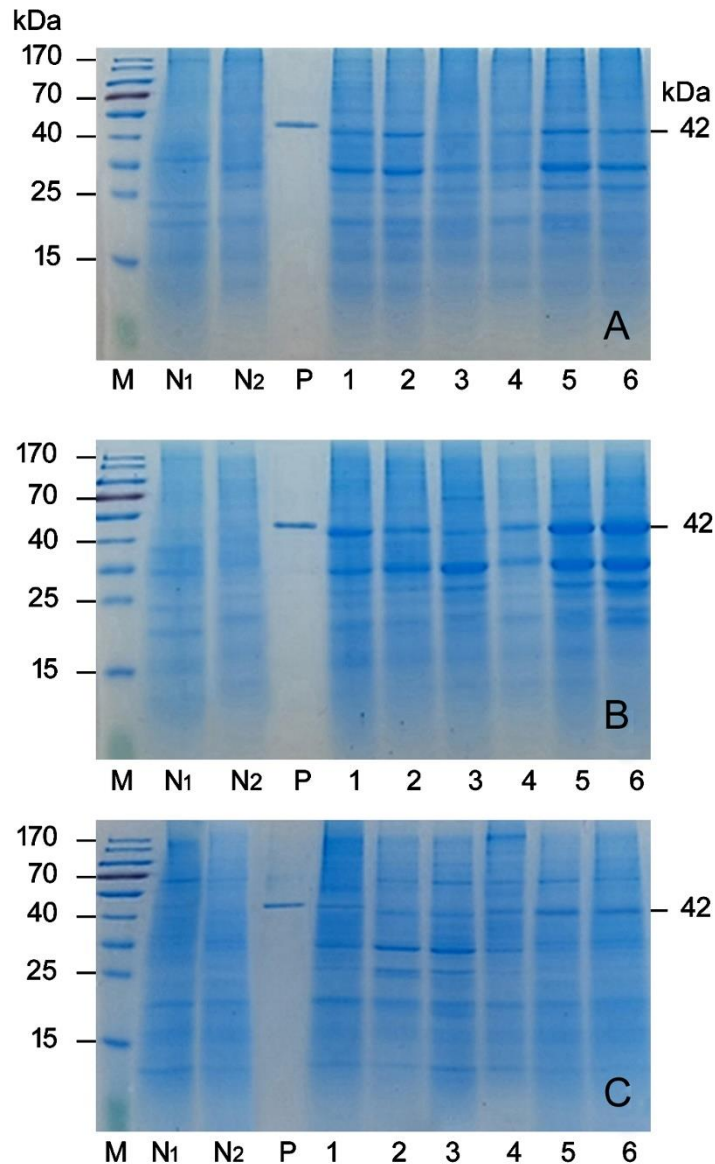
Phân tích SDS-PAGE và Western blot đã được thực hiện để xác định sự biểu hiện tạm thời của các gen chitinase. Các băng protein có kích thước dự kiến khoảng 42 kDa ở cây chuyển gen và đối chứng dương đã được tìm thấy trên gel và trên màng thấm tích (Hình 3.21 và 3.22). Đo cường độ tín hiệu từ Western blot cho thấy mức độ biểu hiện của gen chitinase giảm theo thời gian từ ngày thứ 3 đến ngày thứ 7 sau khi thẩm nhập với các vector đơn (pNHL19). Ngược lại, khi sử dụng hỗn hợp vector (pNHL19 và pMYV508), mức độ biểu hiện của gen chitinase tăng từ ngày thứ 3 đến ngày thứ 7 (*Chi42* và *syncodChi42-2*) hoặc ngày thứ 5 (*syncodChi42-1*), sau đó giảm dần trong những ngày tiếp theo. Nhìn chung, việc sử dụng hỗn hợp vector chỉ tăng biểu hiện của gen *Chi42* và *syncodChi42-2* ở *N. benthamiana*. Gen *syncodChi42-1* được xâm nhiễm bằng vector đơn hay hỗn hợp vector đều có cường độ tín hiệu Western khác nhau không đáng kể (Hình 3.23).

Nói chung, 2 gen chitinase được tối ưu thích hợp cho biểu hiện ở thực vật hơn gen hoang dại *Chi42*, đặc biệt là gen *syncodChi42-2* đã cho thấy mức độ biểu hiện cao hơn đáng kể trên Western blot.

3.4.2. Hoạt tính thủy phân chitin của Ta-CHI42

Hoạt tính thủy phân của enzyme Ta-CHI42 (chitinase 42 kDa) từ cây *N. benthamiana* chuyển gen được đánh giá sơ bộ bằng xét nghiệm đĩa thạch chứa colloidal chitin. Kết quả ở hình 3.24A cho thấy hiệu số của đường kính vòng phân giải (D) và đường kính lỗ đục để nạp enzyme (d) là khoảng 1,5 cm (*syncodChi42-1*) và 1,4 cm (*syncodChi42-2*) sau 3 ngày xâm nhập. Trong khi, hình 3.24B cho thấy vòng phân giải lớn hơn sau 7 ngày đồng xâm nhiễm, $D-d$ của enzyme Ta-CHI42 đạt khoảng 1,6 cm (*syncodChi42-1*) và 1,9 cm (*syncodChi42-2*). Vòng phân giải của enzyme Ta-

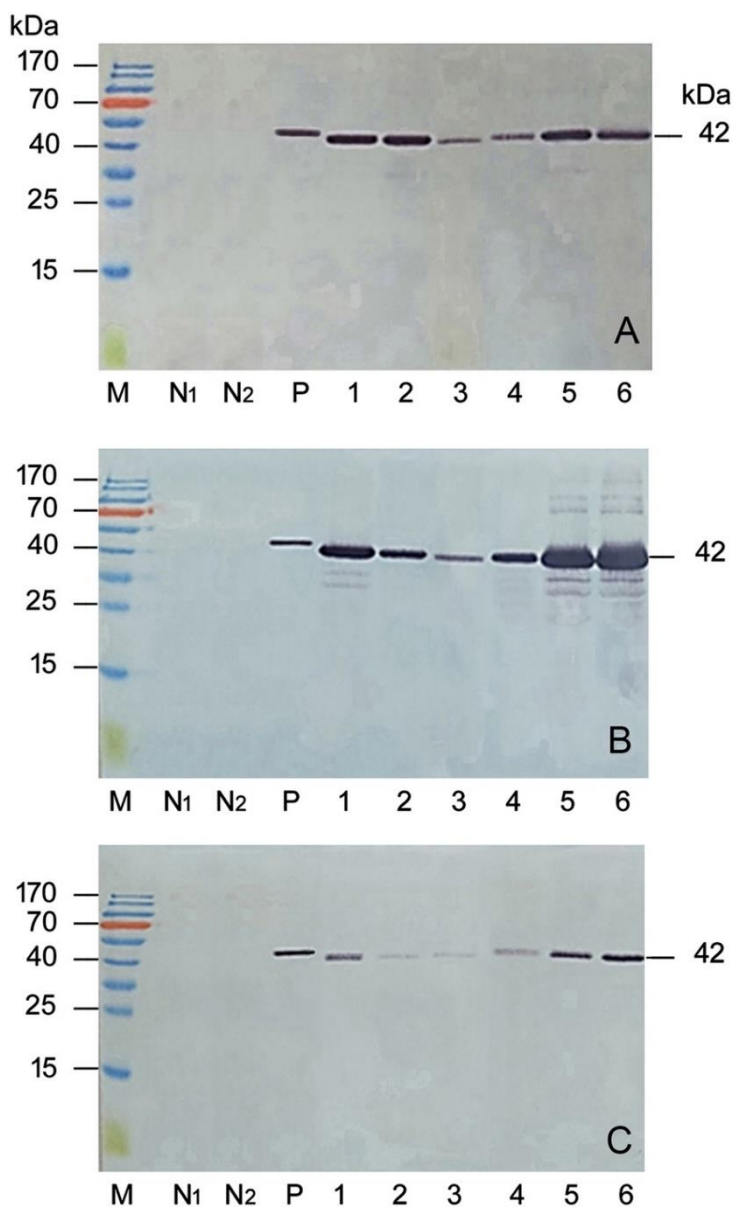
CHI42 từ *N. benthamiana* biến nạp vector pMYV719 không mang gen chitinase hoặc mang gen chitinase kiểu hoang dại (*Chi42*) ở tất cả các nghiệm thức đều yếu hơn so với enzyme Ta-CHI42 từ các gen chitinase đã được tối ưu (*syncodChi42-1* và *syncodChi42-2*).



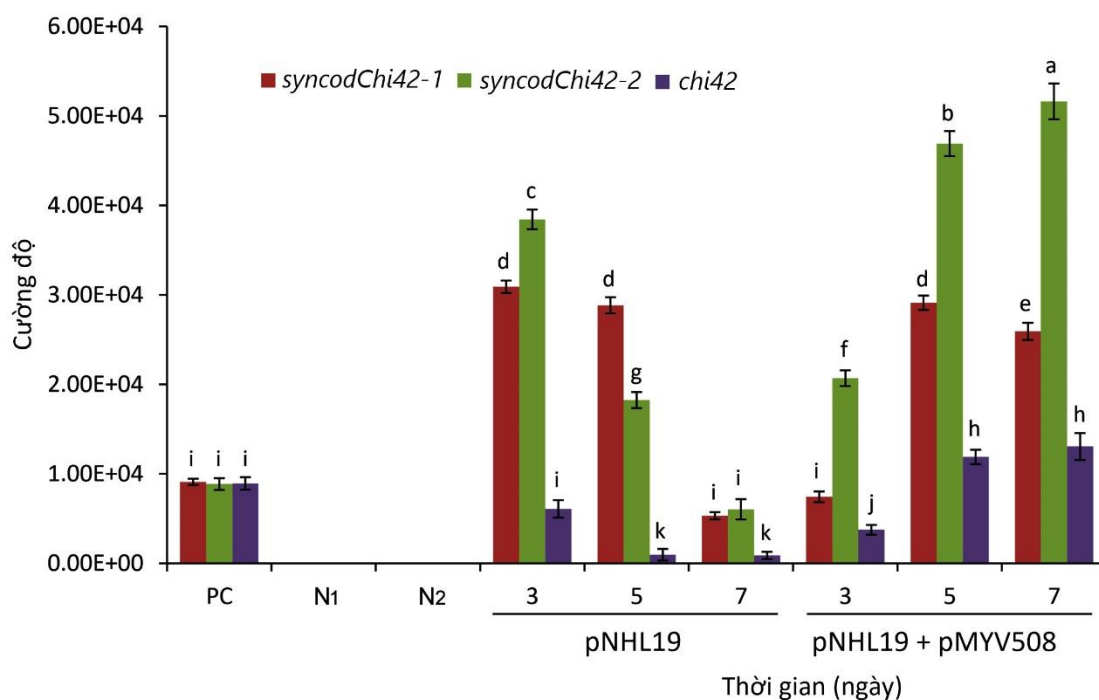
Hình 3.21. Điện di SDS-PAGE dịch chiết protein từ lá cây *N. benthamiana* chuyển gen. A: *syncodChi42-1*, B: *syncodChi42-2* và C: *Chi42*. M: Thang chuẩn khối lượng phân tử protein (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific). P: enzyme Ta-CHI42 tinh sạch làm đối chứng dương. N1 và N2: lần lượt là cây *N. benthamiana* hoang dại và cây *N. benthamiana* biến nạp vector pMYV719 không mang gen chitinase làm đối chứng âm. 1-3: sau 3, 5 và 7 ngày xâm nhiễm (pNHL19), 4-6: sau 3, 5 và 7 ngày đồng xâm nhiễm (pNHL19 và pMYV508).

Enzyme Ta-CHI42 từ dịch chiết protein của lá cây *N. benthamiana* chuyển gen *syncodChi42-2* đạt hoạt độ cao nhất khoảng 290 U/mL khi được đồng xâm nhiễm bởi

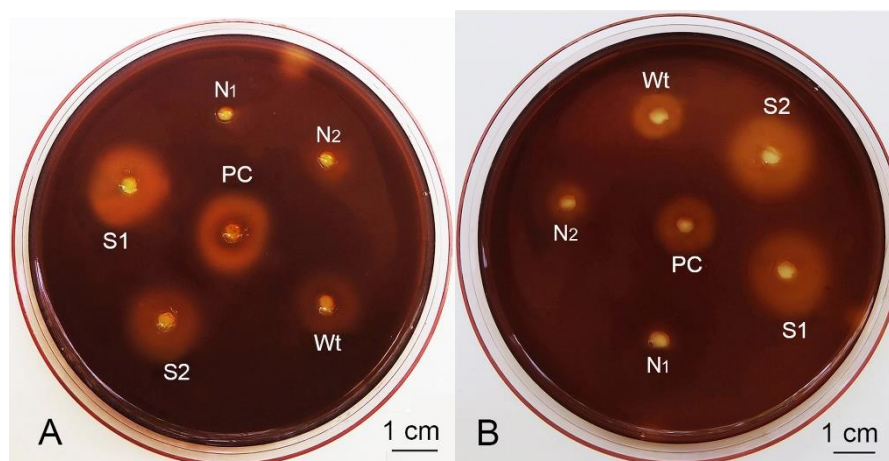
hai vector pNHL19.3 và pMYV508 sau 7 ngày. Enzyme Ta-CHI42 từ gen *syncodChi42-1* cũng có hoạt tính thủy phân chitin khá cao với hơn 180 U/mL sau 7 ngày xâm nhiễm. Trong khi đó, hoạt độ cao nhất của enzyme Ta-CHI42 từ gen *Chi42* chỉ khoảng 110 U/mL, thấp hơn hoạt tính của enzyme Ta-CHI42 từ cây mang gen *syncodChi42-1* và *syncodChi42-2* lần lượt là 1,7 và 2,6 lần (Hình 3.25).



Hình 3.22. Phân tích Western blot dịch chiết protein từ lá cây *N. benthamiana* chuyển gen. A: *syncodChi42-1*, B: *syncodChi42-2* và C: *Chi42*. M: Thang chuẩn khối lượng phân tử protein (PageRuler Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific). P: enzyme Ta-CHI42 tinh sạch từ vi khuẩn làm đối chứng dương. N1 và N2: lần lượt là cây *N. benthamiana* hoang dại và cây *N. benthamiana* biến nạp vector pMYV719 không mang gen chitinase làm đối chứng âm. 1-3: sau 3, 5 và 7 ngày xâm nhiễm (pNHL19), 4-6: sau 3, 5 và 7 ngày đồng xâm nhiễm (pNHL19 và pMYV508).

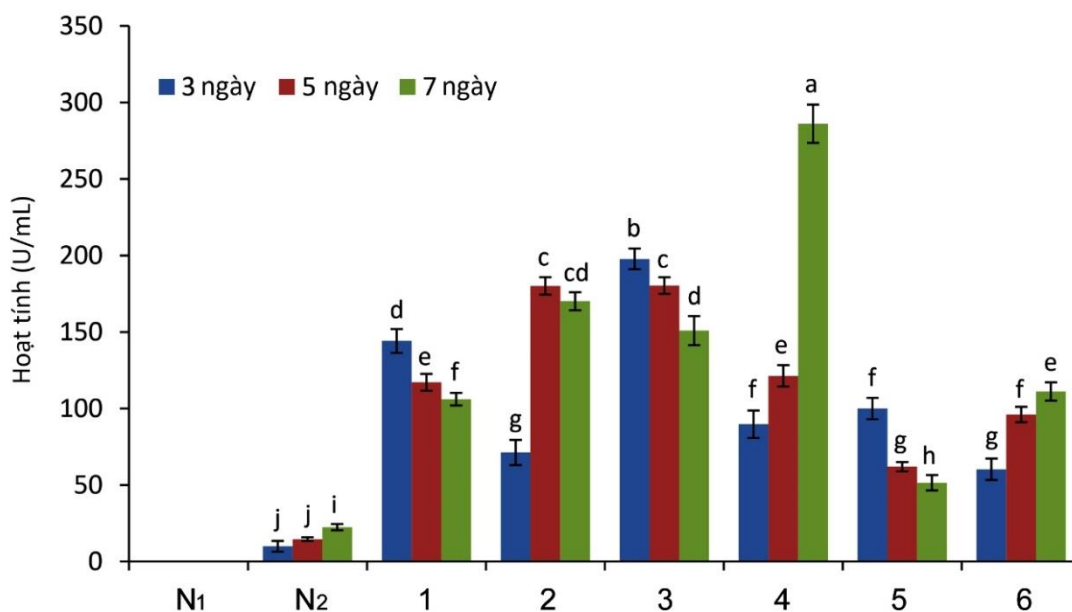


Hình 3.23. Cường độ của tín hiệu Western blot. PC: enzyme Ta-CHI42 tinh sạch từ vi khuẩn làm đối chứng dương. N1 và N2: lần lượt là cây *N. benthamiana* hoang dại và cây *N. benthamiana* biến nạp vector pMYV719 không mang gen chitinase làm đối chứng âm. 3, 5 và 7: sau 3, 5 và 7 ngày xâm nhiễm (pNHL19) và đồng xâm nhiễm (pNHL19 và pMYV508). Các chữ cái khác nhau trên biểu đồ biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê (Duncan's test, $p < 0,05$).



Hình 3.24. Hoạt tính thủy phân colloidal chitin của enzyme Ta-CHI42 từ lá của cây *N. benthamiana* chuyển gen. A: 3 ngày sau khi xâm nhiễm (pNHL19), B: 7 ngày sau khi đồng xâm nhiễm (pNHL19 và pMYV508). S1: *syncodChi42-1*, S2: *syncodChi42-2*, Wt: *Chi42*, PC: enzyme Ta-CHI42 tinh sạch của vi khuẩn làm đối chứng dương, N1 và N2: lần lượt là cây *N. benthamiana* hoang dại và cây *N. benthamiana* biến nạp vector pMYV719 không mang gen chitinase làm đối chứng âm.

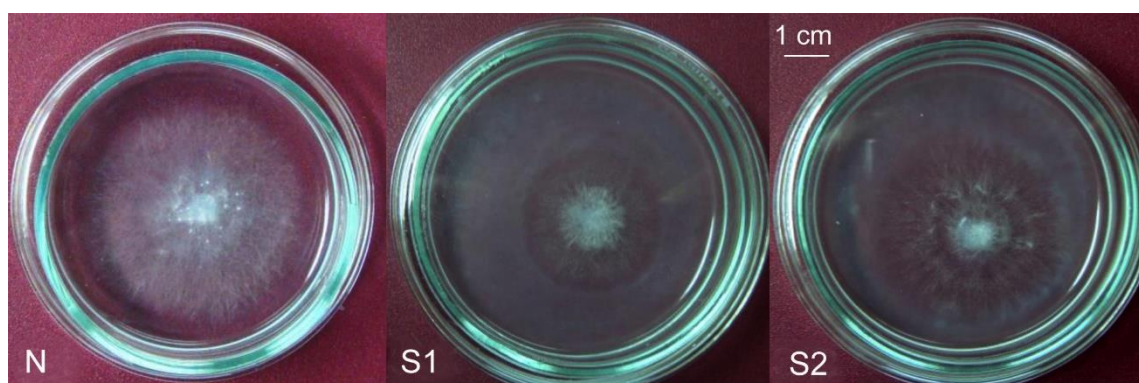
Nhìn chung, enzyme của 2 gen chitinase được tối ưu đã cho thấy hoạt tính thủy phân chitin cao hơn khi được xâm nhiễm vào lá cây *N. benthamiana* cùng với vector pMYV508. So sánh hoạt tính thủy phân chitin và mức độ biểu hiện gen khi phân tích Western blot cho thấy chúng có kết quả tương thích nhau. Kết quả về vòng phân giải trên đĩa thạch chứa colloidal chitin cũng tương tự như hoạt tính thủy phân chitin.



Hình 3.25. Hoạt tính chitinase của enzyme Ta-CHI42 từ cây *N. benthamiana* chuyển gen chitinase sau 3-7 ngày xâm nhiễm. N1 và N2: lần lượt là cây *N. benthamiana* hoang dại và cây *N. benthamiana* biến nạp vector pMYV719 không mang gen chitinase làm đối chứng âm. 1 và 2: xâm nhiễm và đồng xâm nhiễm gen *syncodChi42-1*. 3 và 4: xâm nhiễm và đồng xâm nhiễm gen *syncodChi42-2*. 5 và 6: xâm nhiễm và đồng xâm nhiễm gen *Chi42*. Các chữ cái khác nhau trên biểu đồ biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê (Duncan's test, $p < 0,05$).

3.4.3. Hoạt tính kháng nấm của enzyme Ta-CHI42 trong điều kiện *in vitro*

Hoạt tính kháng nấm của enzyme Ta-CHI42 được xác định dựa trên khả năng ức chế sinh trưởng của sợi nấm gây bệnh thối gốc mủ trắng *S. rolfsii* có thành tế bào chứa chitin. Hoạt tính kháng nấm của Ta-CHI42-1 và Ta-CHI42-2 từ *N. benthamiana* được đồng xâm nhiễm bằng các vector, pNHL19.1 và pNHL19.2 + pMYV508, sau 7 ngày xâm nhiễm được trình bày trong hình 3.26 và bảng 3.8. Nấm *S. rolfsii* đã bị ức chế sinh trưởng trên môi trường chứa Ta-CHI42. Sinh khối tươi của *S. rolfsii* chỉ đạt khoảng 91 mg và 40 mg (khoảng 1 mg và 0,4 mg sinh khối khô) khi chúng được xử lý lần lượt với 60 U/mL của Ta-CHI42-1 và Ta-CHI42-2. Trong khi đó, ở đối chứng *N. benthamiana* hoang dại và *N. benthamiana* biến nạp vector pMYV719 không mang gen chitinase, sinh khối tươi của *S. rolfsii* lên đến 1.201 mg và 959 mg (gần 11 mg và 9 mg sinh khối khô) (Bảng 3.8).



Hình 3.26. Thử nghiệm hoạt tính kháng nấm *S. rolfsii* của enzyme Ta-CHI42 từ cây *N. benthamiana* mang gen *syncodChi42-1* và *syncodChi42-2*. N: cây *N. benthamiana* không chuyển gen chitinase làm đối chứng âm. S1: 60 U/mL Ta-CHI42-1. S2: 60 U/mL Ta-CHI42-2

Bảng 3.8. Ảnh hưởng của enzyme Ta-CHI42 từ cây *N. benthamiana* mang gen *syncodChi42-1* và *syncodChi42-2* lên sinh khối tươi và khô của sợi nấm *S. rolfsii* sau 36 giờ nuôi cấy.

Enzyme	Nồng độ (U/mL)	Sinh khối tươi (mg)	Sinh khối khô (mg)
Ta-CHI42-1	10	902,12 ^c	7,33 ^c
	20	524,67 ^d	5,19 ^d
	40	372,04 ^e	3,32 ^e
	60	91,11 ^g	0,97 ^g
Ta-CHI42-2	10	873,03 ^c	7,01 ^c
	20	504,55 ^d	5,13 ^d
	40	272,82 ^f	2,40 ^f
	60	39,68 ^h	0,37 ^h
NC1		1201,04 ^a	10,73 ^a
NC2		958,88 ^b	8,84 ^b

Chú thích: Ta-CHI42-1: enzyme của gen *syncodChi42-1*. Ta-CHI42-2: enzyme của gen *syncodChi42-2*. NC1: dịch chiết protein từ *N. benthamiana* hoang dại. NC2: dịch chiết protein từ *N. benthamiana* biến nạp vector pMYV719 không mang gen chitinase. Các chữ cái khác nhau trong cùng một cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê (Duncan's test, $p < 0,05$).

Trong thí nghiệm này, các gen chitinase được điều khiển bởi promoter CaMV 35S của virus khảm súp lơ, một trình tự khởi động có thể được kích hoạt trong các mô thực vật khác nhau [255]. Biểu hiện tạm thời của tái tổ hợp *cre* từ xạ khuẩn P1 trong lá của *N. benthamiana* hoặc kháng nguyên nội độc tố tụ cầu B trong lá củ cải (*Raphanus sativus* L.) cũng được điều khiển bởi promoter 35S [145], [155].

Danielson và Pezacki (2013) cho rằng protein P19 dịch mã hai phân tử RNA nhỏ, do đó ức chế quá trình tổng hợp protein [83]. Các nghiên cứu đã chỉ ra rằng biểu hiện tạm thời protein trong lá *N. benthamiana* cho hiệu suất cao hơn khi đồng xâm nhiễm với TBSV *p19* [283]. *Agrobacterium* chứa p35S-GSN đã được đồng xâm nhiễm với một trong những vector mang gen im lặng ức chế virus (ví dụ: p35S-TSBV.p19, p35SCMV.2b, CMV 2b (1-94) bị cắt C-terminal, p35SPRSV.HC-Pro hoặc p35S-TLCV.TrAP) đã làm tăng đáng kể biểu hiện tạm thời của β -glucuronidase (GUS) ở *N. benthamiana* [191]. Yamamoto và cs (2018) tìm thấy trình tự khởi đầu tái bản của geminivirus kết hợp với yếu tố kết thúc kép đã cải thiện rõ rệt biểu hiện tạm thời của protein huỳnh quang xanh lục (GFP) ở *N. benthamiana* thông qua kỹ thuật thâm nhập [292]. Zhao và cs (2017) đã cải thiện hiệu quả biến nạp bằng cách bổ sung một số yếu tố như 5-azacytidine (AzaC), acid ascorbate (ASC), hoặc Tween-20. Các chất này khi được thêm vào dung dịch xâm nhiễm với nồng độ 20 μ M đối với AzaC, 0,56 mM đối với ASC, hoặc 0,03% (v/v) đối với Tween-20 đã làm tăng mức độ biểu hiện GUS trong lá của *N. benthamiana* [298].

Các gen mã hóa chitinase từ một số loài *Trichoderma* như *T. harzianum* và *T. virens* cũng đã được biến nạp vào thuốc lá, khoai tây, bông và táo chống lại một số mầm bệnh như *Alternaria alternata*, *A. solani*, *Botrytis cinerea* và *R. solani* [159], [94], [237]. Tuy nhiên, sự biểu hiện của chitinase có nguồn gốc từ nấm đã được tối ưu trình tự chỉ được tìm thấy trong một số báo cáo chẳng hạn như gen *NiC* từ *Rhizopus oligosporus* vào *Petunia hybrida* [141], thuốc lá và cà chua [144] và *Brassica napus* [140]. Agarwal và cs (2019) cũng đã tối ưu hóa codon của gen *bar* của vi khuẩn để biểu hiện ở thuốc lá. Nghiên cứu cho thấy tỷ lệ thích hợp của các codon tối ưu có thể tạo ra sự biểu hiện cao của gen chuyển. Nếu vượt quá tỷ lệ này, khả năng biểu hiện gen có thể không được cải thiện [28].

Tương tự như kết quả của chúng tôi, các gen như chitinase từ lúa mạch (*Hordeum vulgare* L.) và *CeChi1* từ thông Úc (*Casuarina equisetifolia* L.) đã được đưa vào khoai tây và thuốc lá qua biến nạp *Agrobacterium* đã biểu hiện hoạt động kháng nấm của chúng [281]. Mặt khác, nghiên cứu của Ibrahim và cs (2007) cho thấy sự kích thích nấm làm tăng sản xuất oleandrin trong *Agrobacterium* được biến nạp vào nuôi cấy huyền phù tế bào *Nerium oleander* [122]. Trong nghiên cứu này, vi khuẩn *Agrobacterium* không chèn gen chitinase cũng có tác dụng biểu hiện chitinase trong tế bào thực vật sau khi xâm nhiễm và thực vật sản xuất enzyme như một phản ứng phòng vệ dưới tác nhân kích thích, vì vậy đã nó ức chế nhẹ sự phát triển của *S. rolfsii*.

3.5. ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ YẾU TỐ LÊN HIỆU QUẢ CHUYỂN GEN CHITINASE VÀO CÂY LẠC QUA TRUNG GIAN *A. tumefaciens*

Phương pháp chuyển gen đã được áp dụng trên cây lạc để tạo ra giống lạc có khả năng kháng nấm [168], [169], [280]. Tuy nhiên, hiệu quả chuyển gen thay đổi tùy thuộc vào giống cây nhận gen, gen chỉ thị chọn lọc và chủng *Agrobacterium* [192]. Vì thế, nghiên cứu điều kiện thích hợp cho chuyển gen ở một giống lạc cụ thể trước khi tiến hành là thực sự cần thiết.

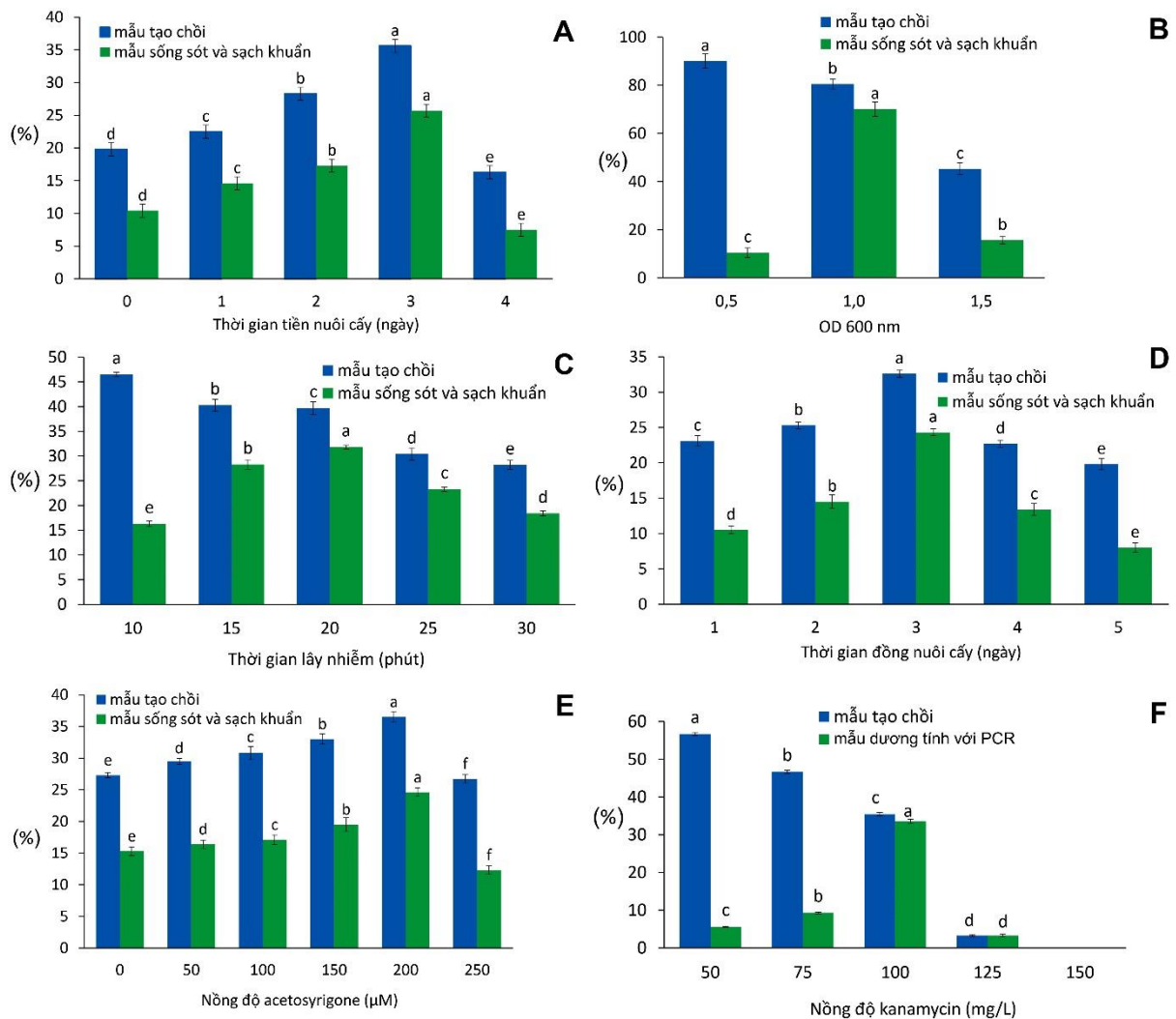
Quá trình biến nạp gen qua trung gian *A. tumefaciens* muốn có hiệu quả cao đòi hỏi phải xác định một số yếu tố ảnh hưởng đến quá trình biến nạp của T-DNA. Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của mật độ tế bào vi khuẩn *Agrobacterium*, thời gian tiên nuôi cấy, lây nhiễm, đồng nuôi cấy, nồng độ acetosyringone, kanamycin và cefotaxime đã được khảo sát. Tất cả các thử nghiệm đã được thực hiện với chủng *A. tumefaciens* LBA4404 mang vector pNHL19.3.

3.5.1. Ảnh hưởng của thời gian tiên nuôi cấy

Tiên nuôi cấy các mẫu vật trước khi lây nhiễm với *Agrobacterium* đã cải thiện đáng kể hiệu quả chuyển gen ở cây lạc (Hình 3.27A). Tỷ lệ mẫu tái sinh chồi và khả năng sống sót của chúng trên môi trường chọn lọc đạt cao nhất khi tiên nuôi cấy 3 ngày. Một số nghiên cứu cho rằng tiên nuôi cấy mẫu vật có thể làm tăng sự phân chia tế bào thực vật giúp T-DNA từ vector biểu hiện dễ dàng biến nạp và tích hợp vào DNA nhân của chúng [166]. Ngoài ra, tiên nuôi cấy mẫu vật trước khi biến nạp gen cũng có tác dụng ngăn chặn những tác động tiêu cực của *Agrobacterium* và các tác nhân chọn lọc lên sự phân chia của tế bào thực vật [171]. Trong số các khoảng thời gian được thử nghiệm, tiên nuôi cấy mẫu vật 3 ngày cho tỷ lệ mẫu tạo chồi (35,6%), mẫu sống sót trên môi trường chọn lọc và sạch khuẩn (25,7%) cao nhất. Thời gian tiên nuôi cấy kéo dài hơn 3 ngày đã làm giảm tỷ lệ mẫu tạo chồi (16,3%). Kết quả của chúng tôi tương đồng với kết quả của Athmaram và cs (2006) [39], Mayavan và cs (2013) [171] và Subramanyam và cs (2013) [256] đều nhận thấy thời gian tiên nuôi cấy 3 ngày cho hiệu quả biến nạp gen cao nhất.

3.5.2. Ảnh hưởng của mật độ vi khuẩn

Trong số các mật độ vi khuẩn *Agrobacterium* được nghiên cứu ($OD_{600} = 0,5-1,5$), $OD_{600} = 1$ cho tỷ lệ mẫu tái sinh chồi (80,5%), tỷ lệ mẫu sống sót và sạch khuẩn (70,12%) cao nhất (Hình 3.27B). Mật độ vi khuẩn *Agrobacterium* trong dịch huyền phù đóng vai trò quan trọng trong biến nạp gen. Theo Rohini và Rao (2000), $OD_{600} = 1$ là giá trị tối ưu cho sự biến nạp của toàn bộ hạt lạc khử phôi của giống lạc TMV-2 [227].



Hình 3.27. Ảnh hưởng của các yếu tố đến tỷ lệ lá mầm có phôi tạo chồi và sống sót ở giống lạc L14 qua biến nạp trung gian *A. tumefaciens*. Các chữ cái khác nhau trên biểu đồ biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê (Duncan's test, $p < 0,05$).

3.5.3. Ảnh hưởng của thời gian lây nhiễm

Kết quả nghiên cứu cho thấy thời gian lây nhiễm cũng ảnh hưởng rõ rệt đến sống sót và tái sinh chồi của các mẫu vật. Thời gian lây nhiễm 20 phút có tỷ lệ mẫu sống sót trên môi trường chọn lọc cao nhất, đạt 31,8% (Hình 3.27C). Thời gian lây nhiễm 25 hoặc 30 phút cho tỷ lệ mẫu sống sót và sạch khuẩn thấp với 23,3% và 18,4%. Từ kết quả thực nghiệm, chúng tôi nhận thấy thời gian lây nhiễm càng lâu thì tỷ lệ mẫu cấy bị nhiễm khuẩn cao, khó diệt khuẩn và khả năng tái sinh chồi kém. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với nghiên cứu của Orlikowska và cs (1995) [196]. Do đó, chúng tôi đã sử dụng thời gian lây nhiễm 20 phút trong các thí nghiệm tiếp theo.

3.5.4. Ảnh hưởng của thời gian đồng nuôi cấy

Kết quả khảo sát yếu tố này đã cho thấy 3 ngày đồng nuôi cấy cho tỷ lệ mẫu sống sót trên môi trường chọn lọc đạt 24,3% và tỷ lệ mẫu tạo chồi cao nhất (32,6%) (Hình

3.27D). Trong quá trình đồng nuôi cấy, T-DNA rời khỏi vi khuẩn *Agrobacterium* và tích hợp vào bộ gen của tế bào thực vật trong một thời gian nhất định tùy thuộc vào các loài thực vật và chủng *Agrobacterium* được sử dụng [274]. Hiệu quả chuyển gen ở cây lạc tăng thêm 9,8-13,8% khi đồng nuôi cấy trong 3 ngày so với đồng nuôi cấy trong thời gian 1-2 ngày. Tuy nhiên, sau 3 ngày đồng nuôi cấy, mật độ cao của vi khuẩn *Agrobacterium* đã làm cho mô bị hóa nâu và hạn chế sự phát sinh chồi của mẫu. Các nghiên cứu tương tự của Mayavan và cs (2013) ở cây mía, cho thấy hiệu suất chuyển gen tăng dần lên và đạt cực đại (24,2%) sau khi đồng nuôi cấy trong 3 ngày. Thời gian đồng nuôi cấy hơn 3 ngày cho hiệu suất chuyển gen giảm do sự phát triển quá mức của vi khuẩn *Agrobacterium* [171]. Manickavasagam và cs (2015) cũng đã thông báo tầm quan trọng của việc tối ưu thời gian (3 ngày) đồng nuôi cấy để nâng cao hiệu quả chuyển gen ở đậu bắp [165]. Park và cs (2005) [204], Chen và cs (2010) [69] cũng cho rằng nuôi cấy trong 3 ngày đã cải thiện hiệu quả chuyển gen ở củ cải và củ.

3.5.5. Ảnh hưởng của nồng độ acetosyringone

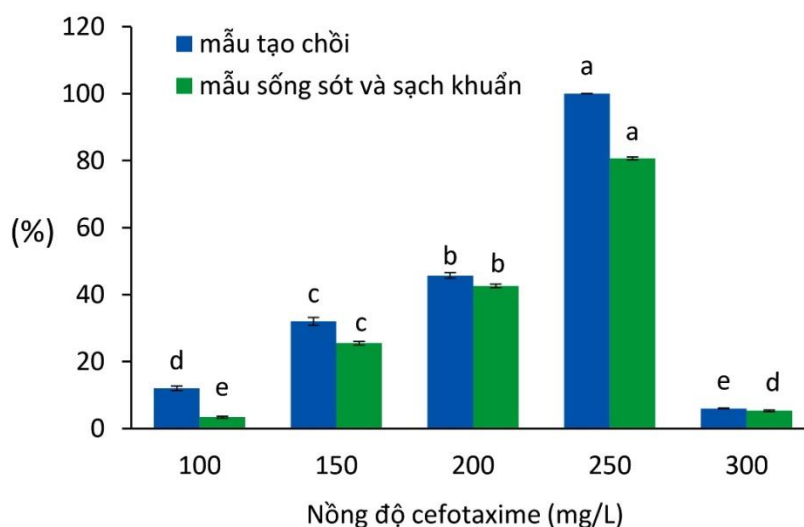
Việc chọn được nồng độ AS thích hợp đóng vai trò quan trọng trong việc nâng cao hiệu suất biến nạp gen. Trong nghiên cứu này, các nồng độ AS khác nhau (25-250 μM) đã được thử nghiệm. Kết quả cho thấy, tỷ lệ mẫu tạo chồi (27,3-36,5%), tỷ lệ mẫu sống sót trên môi trường chọn lọc (15,3-24,6%) được cải thiện khi tăng dần nồng độ AS từ 0-200 μM (Hình 3.27E). Ở nồng độ AS 200 μM , tỷ lệ mẫu tạo chồi và sống sót đạt cao nhất, lần lượt là 36,5% và 24,6%. Bổ sung AS trong môi trường xâm nhiễm và đồng nuôi cấy vượt quá 200 μM làm giảm dần hiệu suất biến nạp. Nghiên cứu của Ashutosh và cs (2012) cho rằng, nồng độ AS thích hợp nâng cao hiệu quả biến nạp gen ở các loài thực vật [38]. Tiwari và cs (2015) đã cho rằng, nồng độ AS 200 μM là tối ưu cho hiệu quả biến nạp và tái sinh chồi cao ở mẫu lá mầm khử phôi của cây lạc [266].

3.5.6. Ảnh hưởng của nồng độ kanamycin

Sau 3 ngày đồng nuôi cấy, mẫu vật được cấy vào môi trường TDT với các nồng độ khác nhau (50-150 mg/L) của kanamycin (Hình 3.27F). Kết quả cho thấy tỷ lệ mẫu cảm ứng tạo chồi cùng với số chồi/mẫu cấy bị giảm khi tăng nồng độ kanamycin. Ở nồng độ kanamycin 100 mg/L có hơn 64% lá mầm có phôi bị ức chế cảm ứng và cho hiệu suất biến nạp gen cao nhất (33,6%), vượt quá nồng độ này mẫu nuôi cấy bị hoại tử. Kết quả nghiên cứu của Marka và cs (2022) ở mẫu lá mầm khử phôi của giống lạc ICG 7827 cũng cho rằng nồng độ kanamycin 100 mg/L phù hợp cho chọn lọc chồi biến nạp và chồi bị hoại tử ở nồng độ kanamycin 125 mg/L [169]. Vì vậy, nồng độ kanamycin 100 mg/L đã được lựa chọn cho các thí nghiệm sàng lọc cây lạc chuyển gen.

3.5.7. Ảnh hưởng của nồng độ cefotaxime

Sau 3 ngày đồng nuôi cấy, các mẫu cấy được rửa bằng môi trường lỏng ½ MS vô trùng có chứa cefotaxime 250 mg/L để loại bỏ vi khuẩn *Agrobacterium* trong mẫu chuyển gen. Sau đó, các mẫu này được nuôi trên môi trường TDT có bổ sung kanamycin 100 mg/L và cefotaxime 100-300 mg/L trong 4 tuần. Kết quả cho thấy ở nồng độ cefotaxime 100 mg/L, tỷ lệ mẫu tạo chồi, mẫu sống sót và sạch khuẩn khá thấp tương ứng là 12% và 3,4% (Hình 3.28). Điều này là do lượng kháng sinh cefotaxime không đủ để giết chết *Agrobacterium*, vi khuẩn phát triển quá mức đã làm chết mẫu. Cefotaxime ở nồng độ 250 mg/L đã loại bỏ hoàn toàn *Agrobacterium*, dẫn đến tỷ lệ mẫu tạo chồi, mẫu sống sót và sạch khuẩn đạt cao nhất (lần lượt 100% và 80,7%). Nồng độ cefotaxime quá cao (300 mg/L) đã ức chế sự tái sinh chồi của mẫu (6%). Nghiên cứu của Sharma và Anjiah (2000) cho rằng nồng độ cefotaxime 250 µg/mL cho hiệu quả biến nạp gen cao (55%) vào lá mầm của cây lạc [243]. Marka và cs (2022) khi chuyển gen *Tc chitil* để tăng cường khả năng kháng nấm ở giống lạc ICG 7827 qua trung gian *A. tumefaciens* LBA4404 sử dụng môi trường chọn lọc chứa cefotaxime 250 mg/L cho hiệu suất biến nạp ở thế hệ T₀ lên tới 70% [169].



Hình 3.28. Ảnh hưởng của nồng độ cefotaxime (mg/L) đến tỷ lệ mẫu tạo chồi, sống sót và sạch khuẩn của cây lạc chuyển gen. Các chữ cái khác nhau trên biểu đồ biểu thị sai khác có ý nghĩa thống kê (Duncan's test, $p < 0,05$).

Như vậy, kết quả nghiên cứu của luận án đã xác định được các điều kiện thích hợp cho việc chuyển gen vào lá mầm chứa phôi của giống lạc L14 qua trung gian *A. tumefaciens* LBA4404. Trong đó, mẫu lá mầm chứa phôi được tiên nuôi cấy 3 ngày trước khi lây nhiễm vi khuẩn, thời gian lây nhiễm là 20 phút ở $OD_{600} = 1,0$ và đồng nuôi cấy với vi khuẩn trong tối 3 ngày trên môi trường có bổ sung cefotaxime 200

mg/L; mẫu chuyển gen được khử khuẩn với 250 mg/L cefotaxime và sàng lọc ở môi trường có chứa 100 mg/L kanamycin cho hiệu quả biến nạp cao. Việc tối ưu hóa các yếu tố trong biến nạp gen giúp cải thiện hiệu suất biến nạp gen chitinase ở giống lạc L14.

3.6. BIẾN NẠP GEN CHITINASE VÀO CÂY LẠC THÔNG QUA *A. tumefaciens*

Các gen chitinase (*Chi42*, *syncodChi42-1*, và *syncodChi42-2*) trong vector biểu hiện thực vật pNHL19 và pNHL20 được điều khiển bởi các promoter tương ứng dp35S và Asy đã được biến nạp vào giống lạc L14 thông qua chủng *A. tumefaciens* LBA4404.

3.6.1. Chuyển gen chitinase vào cây lạc

Vi khuẩn *A. tumefaciens* tái tổ hợp được lây nhiễm vào lá mầm khử phôi, lá mầm chứa phôi và mắt lá mầm của giống lạc L14 theo quy trình đã tối ưu. Kết quả biến nạp được trình bày trong bảng 3.9 và các hình 3.29-3.31.

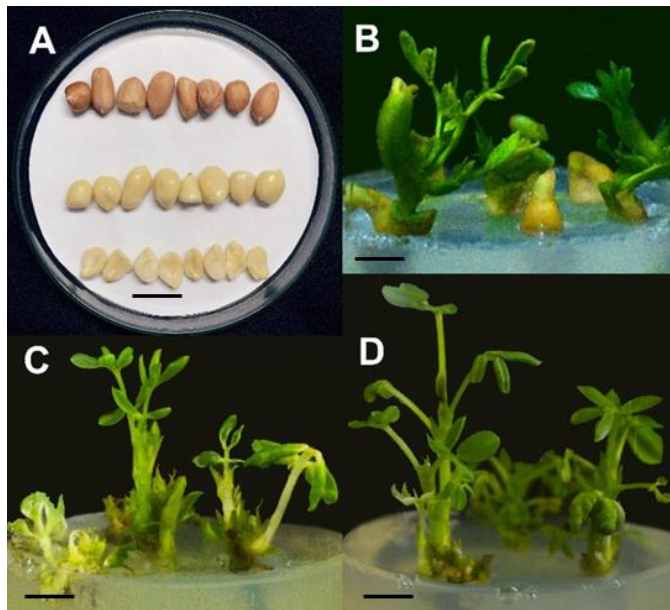
Số liệu trình bày ở bảng 3.9 cho thấy sau 4 tuần nuôi cấy trên môi trường chọn lọc có bổ sung kanamycin và cefotaxime, từ 3 loại mẫu vật đã được biến nạp gen chitinase từ 2 loại vector pNHL19 và pNHL20 thu được lần lượt 364 và 416 chồi tái sinh. Tỷ lệ chồi tái sinh sống sót trên môi trường chọn lọc cao nhất là ở lá mầm chứa phôi với 203 chồi từ vector pNHL19 (*Chi42*: 66 chồi, *syncodChi42-1*: 69 chồi và *syncodChi42-2*: 68 chồi) và 207 chồi từ vector pNHL20 (*Chi42*: 68 chồi, *syncodChi42-1*: 74 chồi, và *syncodChi42-2*: 65 chồi). Tiếp đến là mắt lá mầm với 104 chồi từ vector pNHL19 (*Chi42*: 33 chồi, *syncodChi42-1*: 36 chồi, và *syncodChi42-2*: 35 chồi) và 113 chồi từ vector pNHL20 (*Chi42*: 38 chồi, *syncodChi42-1*: 39 chồi và *syncodChi42-2*: 36 chồi). Thấp nhất là lá mầm khử phôi với 57 chồi từ vector pNHL19 (*Chi42*: 22 chồi, *syncodChi42-1*: 19 chồi, và *syncodChi42-2*: 16 chồi) và 96 chồi từ vector pNHL20 (*Chi42*: 33 chồi, *syncodChi42-1*: 36 chồi và *syncodChi42-2*: 27 chồi). Nhìn chung, các chồi sinh trưởng bình thường trong điều kiện *in vitro*. Bên cạnh đó, các loại mẫu như chồi đỉnh, trụ trên và trụ dưới lá mầm của giống lạc L14 cũng được dùng để biến nạp các gen chitinase nhưng hiệu quả tái sinh chồi của chúng rất kém (Số liệu không trình bày).

Trong một nghiên cứu gần đây, Iqbal và cs (2012) đã thu được 70% cây con sống sót trên môi trường chọn lọc từ mắt lá mầm của cây lạc và 40% trong số đó là cây chuyển gen *chitinase-3* [124]. Sau đó, Prasad và cs (2013) cũng thu được tổng số 65 chồi tái sinh từ các lá mầm trưởng thành của 3 giống lạc khi được đồng nuôi cấy với vi

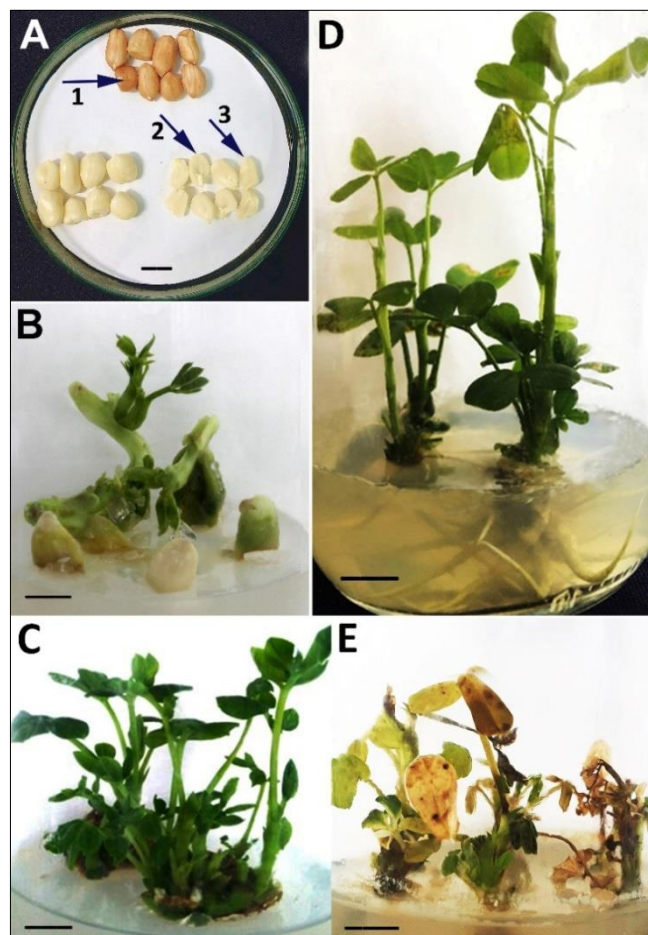
khủng *Agrobacterium* có chứa vector nhĩ thể pCAMBIA:1302 chứa gen *Rchit* mã hóa chitinase lúa [213]. Theo một nghiên cứu khác, khi gen chitinase của thuốc lá đợc đưa vào cây lạc, 40% phôi trực đợc xử lý bằng vi khuẩn *Agrobacterium* đã sinh trưởng thành cây bình thường [227]. Những số liệu này cho thấy rằng kiểu gen và loại mẫu ảnh hưởng đến hiệu quả tái sinh chồi trên môi trường chọn lọc.

Bảng 3.9. Hiệu quả chuyển gen chitinase vào các loại mẫu khác nhau ở cây lạc.

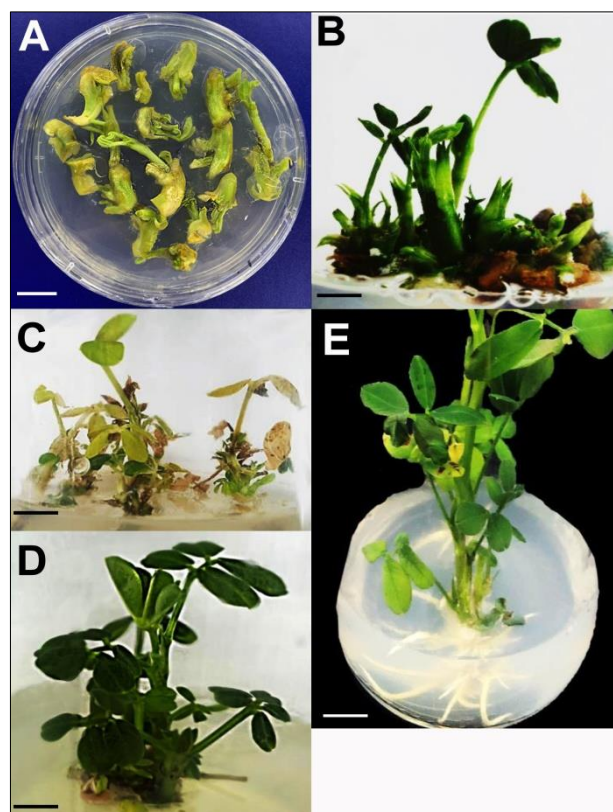
Loại mẫu	Nhóm vector	Gen	Số mẫu biến nạp	Số mẫu tạo chồi	Số chồi/mẫu	Số chồi sống sót trên môi trường chọn lọc	Số chồi dương tính với PCR
Lá mầm chứa phôi	pNHL19	<i>Ch42</i>	200	200	3,57	66	17
		<i>syncodChi42-1</i>	200	200	4,04	69	21
		<i>syncodChi42-2</i>	200	200	4,10	68	25
	pNHL20	<i>Ch42</i>	200	200	4,26	68	33
		<i>syncodChi42-1</i>	200	200	4,07	74	39
		<i>syncodChi42-2</i>	200	200	4,01	65	26
Lá mầm khử phôi	pNHL19	<i>Ch42</i>	200	15	6,08	22	0
		<i>syncodChi42-1</i>	200	19	6,46	19	0
		<i>syncodChi42-2</i>	200	16	6,33	16	0
	pNHL20	<i>Ch42</i>	200	35	7,29	33	18
		<i>syncodChi42-1</i>	200	36	7,05	36	22
		<i>syncodChi42-2</i>	200	30	6,23	27	15
Mắt lá mầm	pNHL19	<i>Ch42</i>	200	200	5,37	33	6
		<i>syncodChi42-1</i>	200	200	5,51	36	8
		<i>syncodChi42-2</i>	200	200	5,67	35	11
	pNHL20	<i>Ch42</i>	200	200	6,00	38	10
		<i>syncodChi42-1</i>	200	200	6,30	39	15
		<i>syncodChi42-2</i>	200	200	5,93	36	13



Hình 3.29. Cây lạc L14 biến nạp vector pNHL19.2. A: lá mầm chứa phôi, B: tái sinh chồi *in vitro* trên môi trường chọn lọc, C: tạo cụm chồi *in vitro* và D: kéo dài chồi *in vitro*. Vạch = 1 cm.



Hình 3.30. Cây lạc L14 biến nạp vector pNHL20.3. A: lá mầm khử phôi và lá mầm chứa phôi được sử dụng làm mẫu cây để chuyển gen chitinase, B: tái sinh chồi của cây lạc chuyển gen trên môi trường chọn lọc, C: tái sinh cụm chồi chuyển gen, D: cây lạc chuyển gen hoàn chỉnh và E: chồi chết trên môi trường chọn lọc. Mũi tên 1: hạt lạc, mũi tên 2: lá mầm chứa phôi, mũi tên 3: lá mầm khử phôi. Vạch = 1 cm.



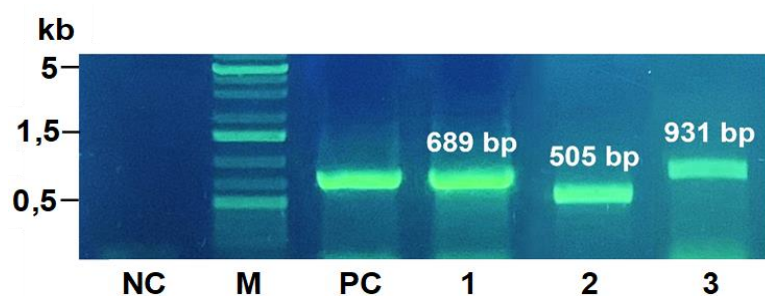
Hình 3.31. Cây lạc L14 biến nạp vector pNHL20.2 vào mắt lá mầm. A: mắt lá mầm được sử dụng làm mẫu cấy để chuyển gen chitinase, B: tái sinh cụm chồi của mắt lá mầm chuyển gen trên môi trường chọn lọc, C: chồi không chuyển gen có dấu hiệu chết trên môi trường chọn lọc, D: chồi chuyển gen trên môi trường kéo dài chồi và E: cây lạc chuyển gen hoàn chỉnh. Vạch = 1 cm.

3.6.2. Sàng lọc các cây lạc chuyển gen bằng PCR

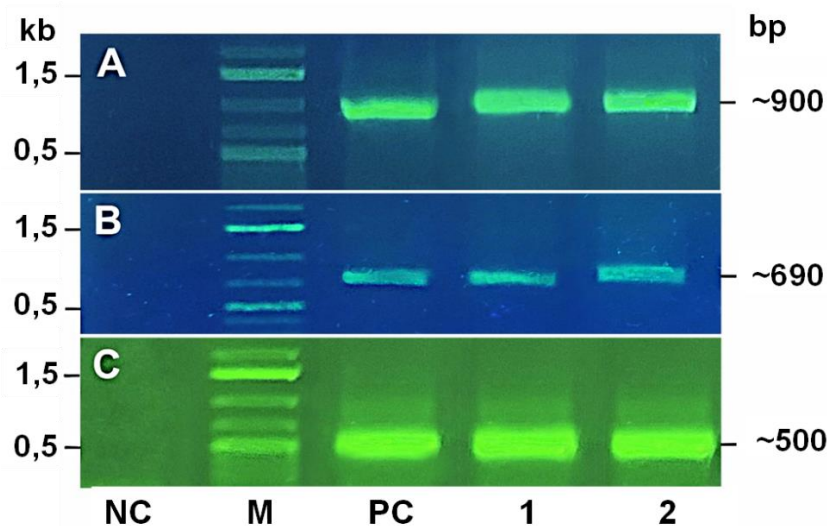
Để xác nhận sự hiện diện của gen chitinase trong bộ gen của cây lạc, các chồi tái sinh sống sót trên môi trường chọn lọc được kiểm tra bằng khuếch đại PCR (Bảng 3.9). Ở lá mầm chứa phôi, đối với vector pNHL19, số chồi dương tính với PCR của mỗi gen là 25,8% (*Chi42*), 30,4% (*syncodChi42-1*) và 36,8% (*syncodChi42-2*) (Hình 3.32); trong khi ở vector pNHL20, tỷ lệ này là 48,5% (*Chi42*), 52,7% (*syncodChi42-1*) và 40% (*syncodChi42-2*). Ở mắt lá mầm, đối với vector pNHL19, tỷ lệ này là 18,2% (*Chi42*), 22,2% (*syncodChi42-1*) và 31,4% (*syncodChi42-2*); trong khi ở vector pNHL20, tỷ lệ này là 26,3% (*Chi42*), 38,5% (*syncodChi42-1*) và 36,1% (*syncodChi42-2*). Ở lá mầm khử phôi, các mẫu được biến nạp vector pNHL20 cho tỷ lệ chồi tái sinh dương tính PCR cao nhất, 54,5% (*Chi42*), 61,1% (*syncodChi42-1*) và 55,6% (*syncodChi42-2*) (Hình 3.33); trong khi không có chồi tái sinh nào dương tính với PCR được tìm thấy ở các mẫu được biến nạp vector pNHL19. Kết quả này có thể là do chúng tôi chưa tìm được các điều kiện thích hợp để chuyển vector pNHL19 chứa gen

chitinase vào lá mầm khử phôi của cây lạc. Nhưng cũng có thể do lá mầm khử phôi của giống lạc L14 không phải là loại mẫu vật thích hợp để biến nạp gen mã hóa chitinase 42 kDa dưới sự điều khiển của promoter dp35S [243].

Mặc dù tỷ lệ tái sinh chồi trên môi trường chọn lọc là quan trọng, nhưng số lượng cây chuyển gen và mức độ biểu hiện gen của chúng mới là yếu tố quyết định. Trên thực tế, biến nạp qua trung gian *Agrobacterium* có thể thực hiện trên các loại mẫu khác nhau của cây lạc. Iqbal và cs (2012) phát triển quy trình chuyển gen chitinase từ cây lúa sang mầm lá của cây lạc với hiệu suất khoảng 42% [124]. Hiệu suất biến nạp của cây lạc chuyển gen *Rchit* dao động từ 70% ở giống JL 24 đến 40% và 55% ở giống ICGV 89104 và ICGV 86031 [213]. Sharma và Anjaiah (2000) đã sử dụng quy trình biến nạp qua *Agrobacterium* với lá mầm khử phôi của giống lạc JL-24 để đạt được tỷ lệ cây lạc chuyển gen cao (55%) trong số cây con sống sót trên môi trường chọn lọc [243]. Chen và cs (2015) đã nghiên cứu quá trình biến nạp qua trung gian *Agrobacterium* của cây lạc và nhận thấy các lá mầm chứa phôi của hai giống lạc, Huayu 20 và 26, có hiệu suất biến nạp lần lượt là 62,61 và 61,61%, trong khi các mẫu cấy có nguồn gốc từ lóng sơ khởi (mesocotyl) có hiệu suất biến nạp là 71,58 và 76,92% [67]. Phối hợp giữa các kết quả của chúng tôi với các nghiên cứu được trích dẫn ở trên đã cho thấy nền tảng di truyền của cây nhận gen và các loại mẫu vật được sử dụng để biến nạp đều có tác động đến hiệu quả chuyển gen [71], [253]. Nhìn chung, dường như các nghiên cứu về hiệu quả biến nạp của gen chitinase chuyển vào cây lạc chưa được quan tâm đúng mức. Thậm chí có rất ít báo cáo về việc chuyển gen chitinase vào cây lạc, trong đó có các gen chitinase có nguồn gốc từ vi sinh vật như nấm.



Hình 3.32. Khuếch đại PCR đoạn chỉ thị của các gen mã hóa chitinase 42 kDa ở cây lạc chuyển gen dùng vector pNHL19. M: thang chuẩn DNA 1 kb Plus (Thermo Scientific), PC: vector pMYV719 chứa gen *syncodChi42-1* làm đối chứng dương, NC: cây lạc không chuyển gen làm đối chứng âm, 1: *syncodChi42-1*, 2: *Chi42* và 3: *syncodChi42-2*.



Hình 3.33. Khuếch đại PCR đoạn chỉ thị của các gen mã hóa chitinase kDa ở cây lạc chuyển gen dùng vector pNHL20. A: *syncodChi42-2*, B: *syncodChi42-1*, C: *Chi42*. M: thang chuẩn DNA 1 kb Plus (Thermo Scientific), NC: cây lạc không chuyển gen làm đối chứng âm, PC: vector pNHL20 chứa gen *Chi42*, 1 và 2: các cá thể chuyển gen chitinase.

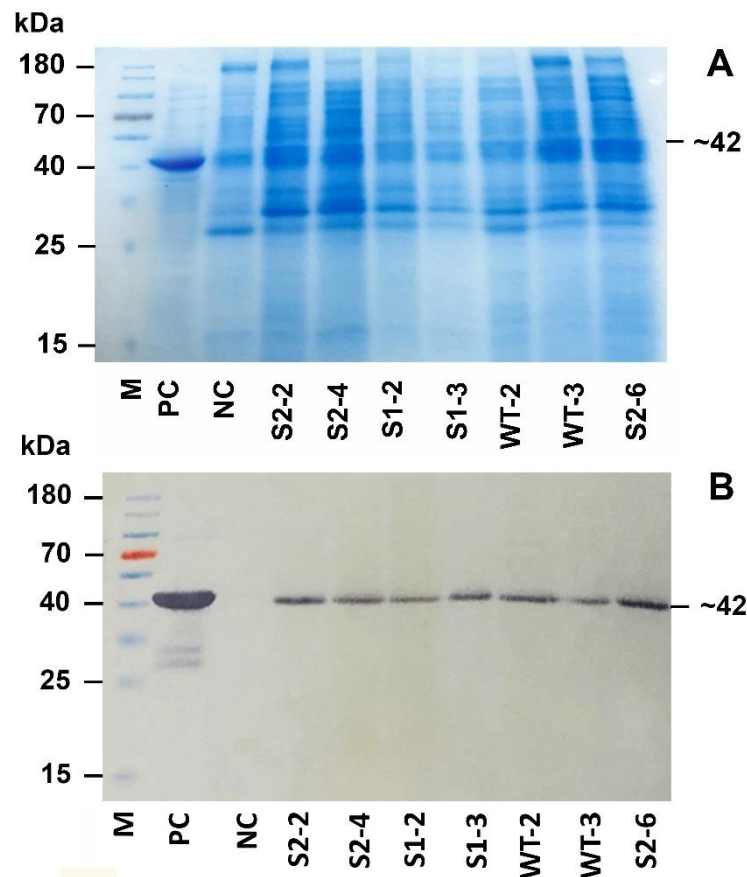
3.6.3. Biểu hiện các gen chitinase trong cây lạc

Sự biểu hiện của các gen chitinase trong cây lạc chuyển gen được kiểm tra bằng SDS-PAGE và Western blot. Đối với các cây chuyển gen dùng vector pNHL19, trên gel polyacrylamide cho thấy một băng protein có MW như dự đoán khoảng 42 kDa (Hình 3.34A), tương tự như MW của chitinase 42 kDa ở chủng nấm *T. asperellum* SH16. Tuy nhiên, không phải tất cả các cây chuyển gen mang vector pNHL19 đều cho thấy băng protein này; chỉ 12/17 cây (*Chi42*), 15/21 cây (*syncodChi42-1*) và 18/25 cây (*syncodChi42-2*) có băng protein 42 kDa (Số liệu không trình bày). Đối với các cây chuyển gen dùng vector pNHL20, tất cả các mẫu trên gel polyacrylamide đều cho thấy một băng protein có MW khoảng 42 kDa (Hình 3.35A).

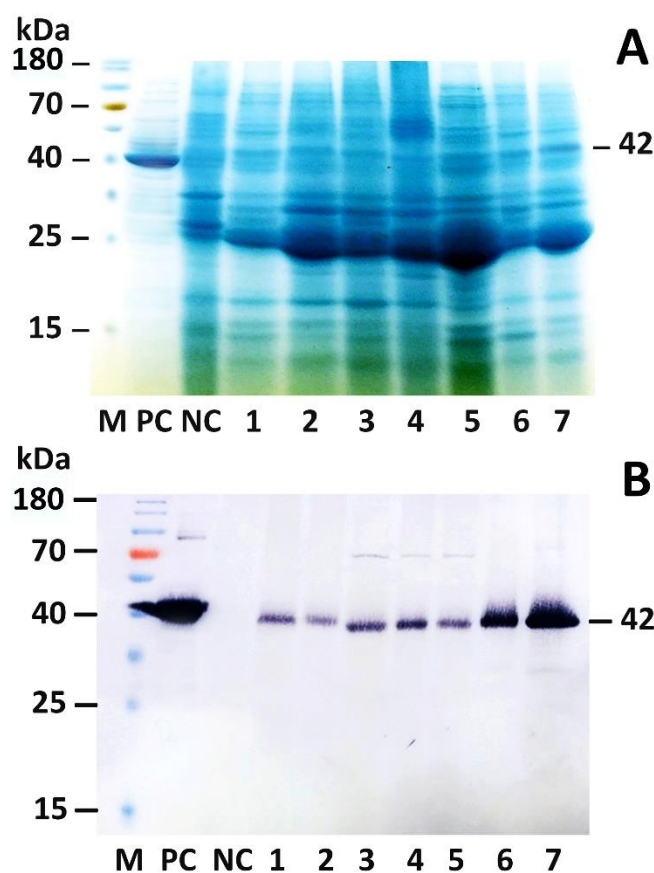
Phân tích Western blot được thực hiện trên các dòng lạc chuyển gen có băng protein 42 kDa có thể quan sát trên SDS-PAGE. Ngoại trừ đối chứng âm không chuyển gen, phần lớn các dòng lạc chuyển gen được kiểm tra và đối chứng dương đều cho thấy tín hiệu tương tác kháng nguyên - kháng thể (Hình 3.34B và Hình 3.35B). Hình 3.34B đại diện cho 7 dòng lạc chuyển gen dùng vector pNHL19 có tín hiệu mạnh nhất (*Chi42*: 2 dòng, *syncodChi42-1*: 2 dòng và *syncodChi42-2*: 3 dòng). Đối với các dòng lạc chuyển gen dùng vector pNHL20, dòng S2A-12 (*syncodChi42-2*) có tín hiệu mạnh nhất, trong khi dòng S1A-15 (*syncodChi42-1*) và dòng WTA-2 (*Chi42*) tín hiệu yếu hơn. Những kết quả này cho thấy cây lạc chuyển gen đã biểu hiện thành công chitinase 42 kDa từ *T. asperellum* SH16 (Ta-CHI42). Tuy nhiên, hiệu ứng vị trí có thể ảnh hưởng đến mức độ biểu hiện của các gen ngoại lai trong cây chuyển gen, một số

dòng chuyển gen được kiểm tra không thể hiện được bằng protein 42 kDa trên SDS-PAGE hoặc chỉ có các tín hiệu yếu trên Western blot [48], [211]. Hiệu ứng vị trí là khái niệm được sử dụng để mô tả sự thay đổi biểu hiện của các gen chuyển giống hệt nhau chèn vào các vùng khác nhau của bộ gen. Trong trường hợp này, sự khác biệt trong biểu hiện thường do các chất tăng cường quy định các gen lân cận. Các chất tăng cường cục bộ này cũng có thể ảnh hưởng đến kiểu biểu hiện của gen chuyển. Vì mỗi sinh vật chuyển gen có gen chuyển ở một vị trí khác nhau nên mỗi sinh vật chuyển gen có tiềm năng cho một kiểu biểu hiện duy nhất [51], [96].

Theo tìm hiểu của chúng tôi, cho đến nay chưa có nghiên cứu nào sử dụng tương tác kháng nguyên - kháng thể như Western blot để xác định biểu hiện gen chitinase trong cây lạc chuyển gen. Phần lớn các nghiên cứu tập trung vào biểu hiện phiên mã hoặc hoạt tính của chitinase trong cây lạc chuyển gen, cũng như hiệu quả kháng nấm của chúng [67], [124], [213], [243].



Hình 3.34. Phân tích biểu hiện của Ta-CHI42 ở các cây lạc chuyển gen dùng vector pNHL19. A: SDS-PAGE và B: 7 dòng lạc chuyển gen chitinase 42 kDa có tín hiệu Western blot mạnh nhất. M: thang chuẩn khối lượng protein 180-10 kDa (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific), PC: Ta-CHI42 tinh sạch từ vi khuẩn được sử dụng làm đối chứng dương, NC: cây lạc không chuyển gen được sử dụng làm đối chứng âm, WT: *Chi42*, S1: *syncodChi42-1*, S2: *syncodChi42-2*. Chữ số theo sau ký hiệu gen là các dòng lạc chuyển gen khác nhau.

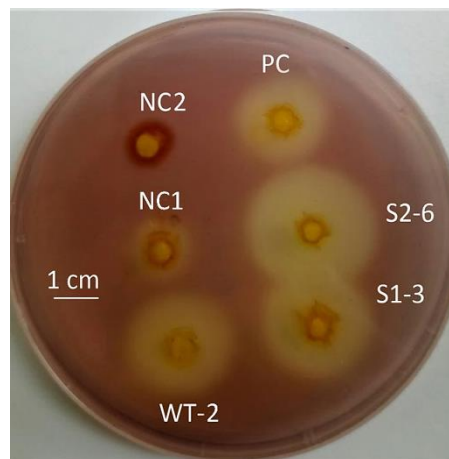


Hình 3.35. Phân tích biểu hiện của Ta-CHI42 ở các cây lạc chuyển gen dùng vector pNHL20. A: SDS-PAGE và B: Western blot của một số dòng lạc chuyển gen chitinase có PCR dương tính. M: thang chuẩn khối lượng protein 180-10 kDa (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific); PC: chitinase 42 kDa tinh sạch từ vi khuẩn làm đối chứng dương; NC: cây lạc không chuyển gen làm đối chứng âm; 1 và 2: 2 dòng lạc chuyển gen *Chi42* lần lượt là WTA-2 và WTA-4; 3, 4 và 7: 3 dòng lạc chuyển gen *syncodChi42-2* lần lượt là S2A-13, S2A-14 và S2A-12; 5 và 6: 2 dòng lạc chuyển gen *syncodChi42-1* lần lượt là S1A-9 và S1A-15.

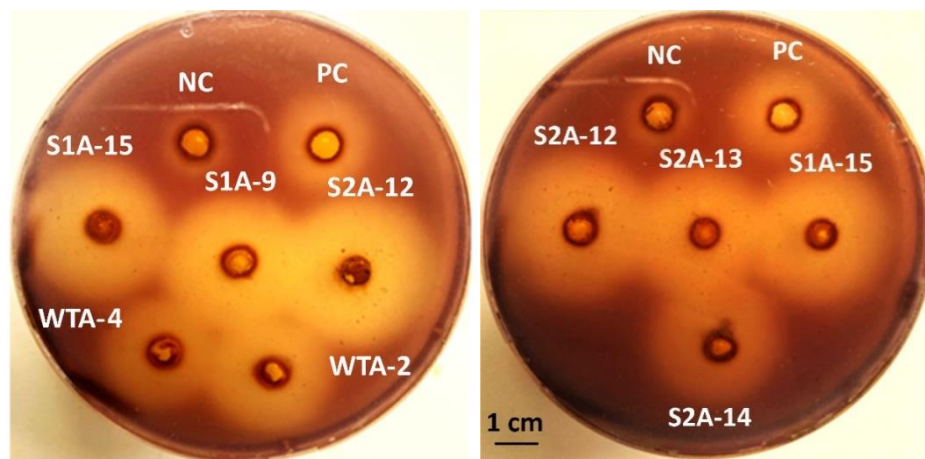
3.6.4. Hoạt tính thủy phân chitin của chitinase

Các dòng lạc chuyển gen chitinase 42 kDa (3 dòng đối với vector pNHL19 và 7 dòng đối với vector pNHL20) với các tín hiệu Western blot mạnh nhất đã được chọn để phân tích hoạt tính thủy phân colloidal chitin trên đĩa thạch. Ở các dòng lạc chuyển gen dùng vector pNHL20, Hiệu số *D-d* lớn nhất (khoảng 2,4 cm) được tìm thấy ở cây lạc mang gen *syncodChi42-2* (dòng S2A-12), cao hơn khoảng 1,2 và 1,4 lần so với *syncodChi42-1* (dòng S1A-15) và *Chi42* (dòng WTA- 2). Trong khi đó, ở các dòng lạc chuyển gen dùng vector pNHL19, hiệu số *D-d* lớn nhất là khoảng 1,8 cm đối với *Chi42* (dòng WT-2), 1,9 cm đối với *syncodChi42-1* (dòng S1-3) và 2,5 cm đối với *syncodChi42-2* (dòng S2-6). Cây lạc không chuyển gen được sử dụng làm đối chứng âm không cho thấy sự thủy phân colloidal chitin (Hình 3.36, Hình 3.37). Những kết quả này phù hợp với kết quả thu được bằng Western blot đã xác nhận rằng chitinase 42

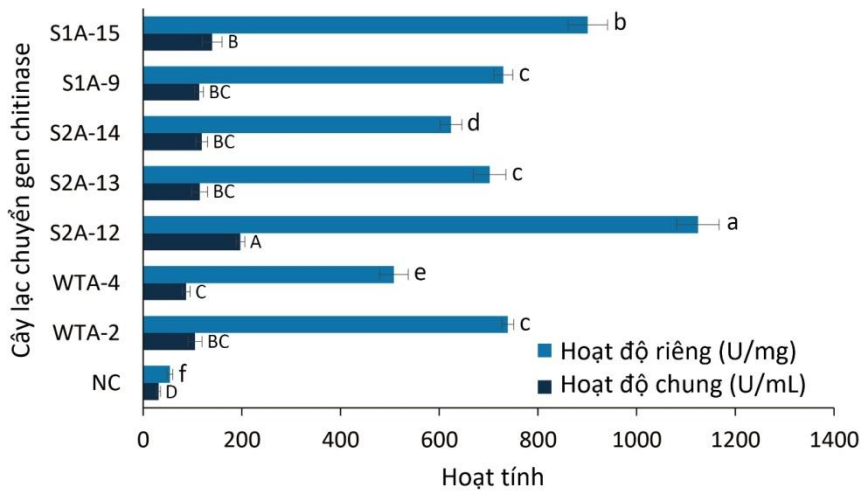
kDa có trong cây lạc chuyển gen tồn tại ở dạng hoạt động. Dòng S2A-12 cũng cho thấy hoạt tính chitinase cao nhất là 1,124 U/mg (197 U/mL) trong số cây lạc chuyển gen được tái sinh từ lá mầm chứa phôi, cao hơn 1,3 (1,4) và 1,5 (1,9) lần so với dòng S1A-15 và dòng WTA-2 (Hình 3.38). Trong khi đó, ở các dòng lạc được chuyển gen dùng vector pNHL19, dòng S2-6 có hoạt tính chitinase cao nhất, với 823 U/mg (117 U/mL), tiếp đến là dòng S1-2 với 732 U/mg (113 U/mL), WT-2 với 593 U/mg (108 U/mL) và thấp nhất là đối chứng không chuyển gen, chỉ khoảng 35,4 U/mg (22,6 U/mL) (Hình 3.39).



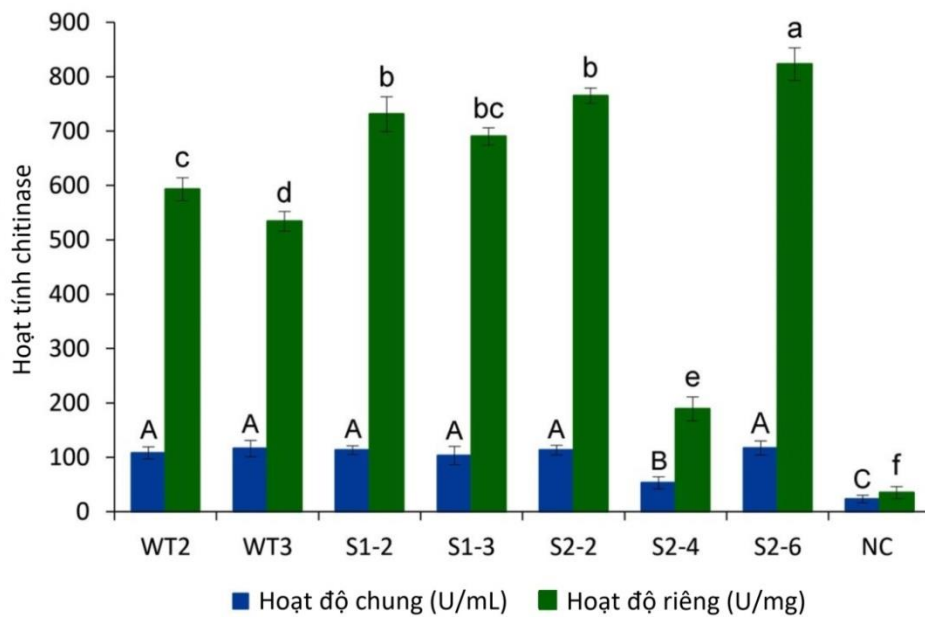
Hình 3.36. Hoạt tính thủy phân colloidal chitin của enzyme Ta-CHI42 từ dịch chiết protein của rễ cây lạc chuyển gen dùng vector pNHL19. PC: chitinase 42 kDa tinh sạch từ vi khuẩn được sử dụng làm đối chứng dương, NC1: cây lạc không chuyển gen và NC2: đệm phosphate làm đối chứng âm, WT-2: *Chi42*, S1-3: *syncodChi42-1*, S2-6: *syncodChi42-2*.



Hình 3.37. Hoạt tính thủy phân colloidal chitin của enzyme Ta-CHI42 từ dịch chiết protein của rễ cây lạc chuyển gen dùng vector pNHL20. PC: chitinase 42 kDa tinh sạch từ vi khuẩn được sử dụng làm đối chứng dương, NC1: cây lạc không chuyển gen làm đối chứng âm, S2A-12, S2A-13 và S2A-14: *syncodChi42-2*; S1A-9 và S1A-15: *syncodChi42-1*; WTA-2 và WTA-4: *Chi42*.



Hình 3.38. Hoạt tính chitinase của các dòng lạc chuyển gen dùng vector pNHL20. NC: cây không chuyển gen được sử dụng làm đối chứng âm. WTA2, WTA-4: *Chi42*, S1A-9, S1A-15: *syncodChi42-1*, S2A-12, S2A-13 và S2A-14: *syncodChi42-2*. Các chữ cái khác nhau trên biểu đồ chỉ ra sự sai khác có ý nghĩa thống kê (Duncan's test, $p < 0,05$).



Hình 3.39. Hoạt tính chitinase của các dòng lạc chuyển gen dùng vector pNHL19. NC: cây không chuyển gen được sử dụng làm đối chứng âm. WT2, WT-3: *Chi42*, S1-2, S1-3: *syncodChi42-1*, S2-4, S2-6: *syncodChi42-2*. Các chữ cái khác nhau trên biểu đồ chỉ ra sự sai khác có ý nghĩa thống kê (Duncan's test, $p < 0,05$).

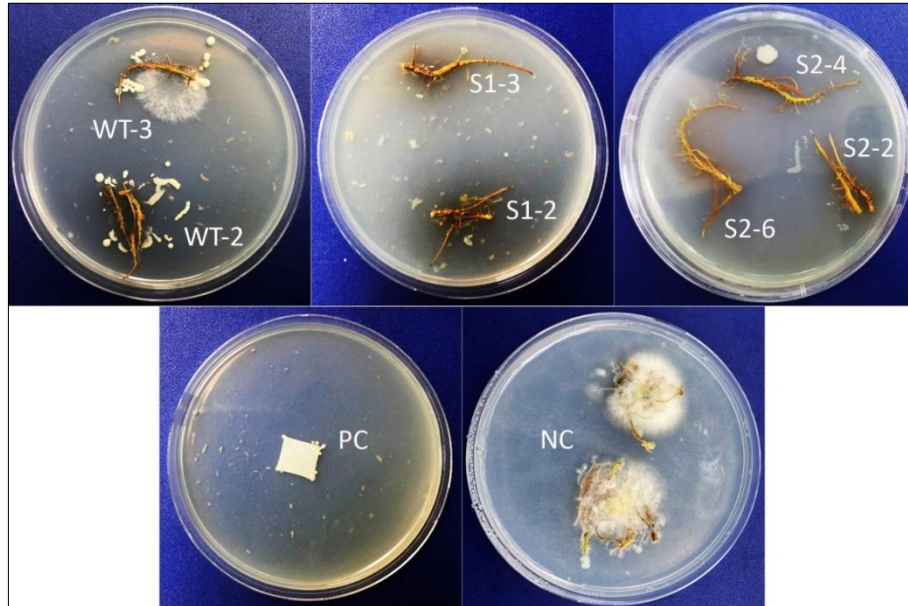
Nhìn chung, mức độ biểu hiện chitinase giữa các dòng lạc chuyển gen và giữa các gen được nghiên cứu là khác nhau. Trong hầu hết các trường hợp, các gen đã được tối ưu *syncodChi42-1* và *syncodChi42-2* biểu hiện mạnh hơn gen hoang dại *Chi42*. Theo kết quả nghiên cứu đã trình bày trong mục 3.4.2 của luận án, hoạt tính của các gen *syncodChi42-1* và *syncodChi42-2* biểu hiện ở *N. benthamiana* lớn hơn lần lượt 1,7 và 2,6 lần so với gen *Chi42*. Điều này chứng tỏ rằng các gen được tối ưu hóa codon

hoạt động ở thực vật mạnh hơn gen tự nhiên có nguồn gốc từ nấm. Theo một số nghiên cứu, thực vật không sản xuất hoặc chỉ sản xuất số lượng chitinase tối thiểu trừ khi chúng được kích hoạt bởi nấm bệnh [75], [110], [216]. Trong luận án này, dịch chiết từ rễ cây lạc không chuyển gen *in vitro* và cây lạc chuyển gen chitinase không nhiễm nấm đã được sử dụng để xác định hoạt tính thủy phân chitin trên đĩa colloidal chitin và hoạt độ của chitinase. Mặc dù cây lạc không chuyển gen cũng tạo ra chitinase nhưng chỉ với một lượng không đáng kể nên hoạt tính của chitinase thấp và vòng thủy phân nhỏ. Prasad và cs (2013) và Iqbal và cs (2012) đã cải thiện hoạt tính chitinase của lạc lên 2-14 lần và cao hơn 1,8-6,5 lần so với đối chứng không chuyển gen bằng cách chuyển gen *Rchit* và các gen chitinase từ lúa [124], [213]. Rohini và Sankara Rao (2001) cũng biểu hiện thành công gen chitinase thuốc lá trong cây lạc, gen này được kiểm soát bởi promoter CaMV 35S [227]. Theo nghiên cứu của luận án này, hoạt tính thủy phân chitin được biểu hiện ở các dòng lạc chuyển gen của giống L14 đều cao hơn so với đối chứng là cây lạc không chuyển gen. Các gen chitinase được tối ưu hóa *syncodChi42-1* và *syncodChi42-2* đã cho thấy khả năng tương thích với hệ thống biểu hiện của tế bào thực vật.

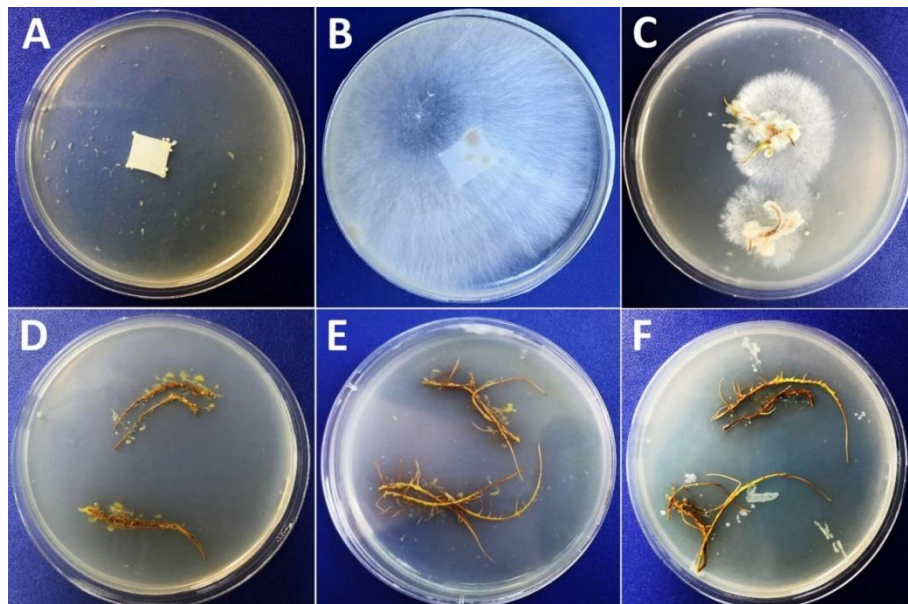
3.6.5. Hoạt tính kháng nấm của các dòng lạc chuyển gen

Dựa trên kết quả phân tích Western blot và xác định hoạt tính chitinase của enzyme Ta-CHI42, các dòng lạc chuyển gen có hoạt tính chitinase cao nhất đã được chọn để đánh giá hiệu quả kháng nấm của chúng. Hiệu quả kháng nấm của rễ các dòng lạc chuyển gen được đánh giá cả trong điều kiện *in vitro* và *in vivo*. Trên môi trường chứa rễ của các dòng lạc chuyển gen chitinase, sự phát triển của *S. rolf sii*, gây bệnh héo rũ mốc trắng, bị ức chế đáng kể sau 96 giờ xử lý. Kết quả cho thấy chitinase ngoại bào từ rễ của tất cả các dòng lạc nghiên cứu thể hiện hoạt tính kháng nấm mạnh đối với *S. rolf sii*, đối chứng dương cũng cho kết quả tương tự, ngoại trừ dòng WT-3 và đối chứng âm (Hình 3.40 và 3.41). Hình 3.41B và 3.41C cho thấy dường như chitinase của rễ cây lạc không chuyển gen cũng được tiết ra nhưng không đủ để ức chế hoàn toàn sự phát triển của nấm. Kết quả thử nghiệm hoạt tính kháng nấm của 16 dòng lạc chuyển gen có biểu hiện tín hiệu Western blot mạnh đã thu được các phản ứng tích cực trong điều kiện *in vivo* (Hình 3.42). *S. rolf sii* xuất hiện trong đất và ở gốc cây lạc (Hình 3.42A, B, D-G, và I-L), và thậm chí trên thân cây (Hình 3.42C) sau khoảng 2 tuần lây nhiễm nấm. Tuy nhiên, nấm *S. rolf sii* chỉ gây chết 2 đối chứng không chuyển gen, trong khi các dòng lạc chuyển gen chitinase không hề bị nhiễm nấm. Hình 3.42H mô tả sự khác biệt màu sắc giữa lớp đất bề mặt không bị nhiễm nấm và bị nhiễm nấm trong hình 3.42A-G và I-L. Khả năng kháng *S. rolf sii* của các dòng lạc chuyển gen chitinase 42 kDa trồng trong điều kiện *in vivo* được đánh giá theo thang điểm 1-5 như trong bảng 3.10. Các dòng lạc chuyển gen đều có xếp hạng bệnh thấp, thay đổi từ 1

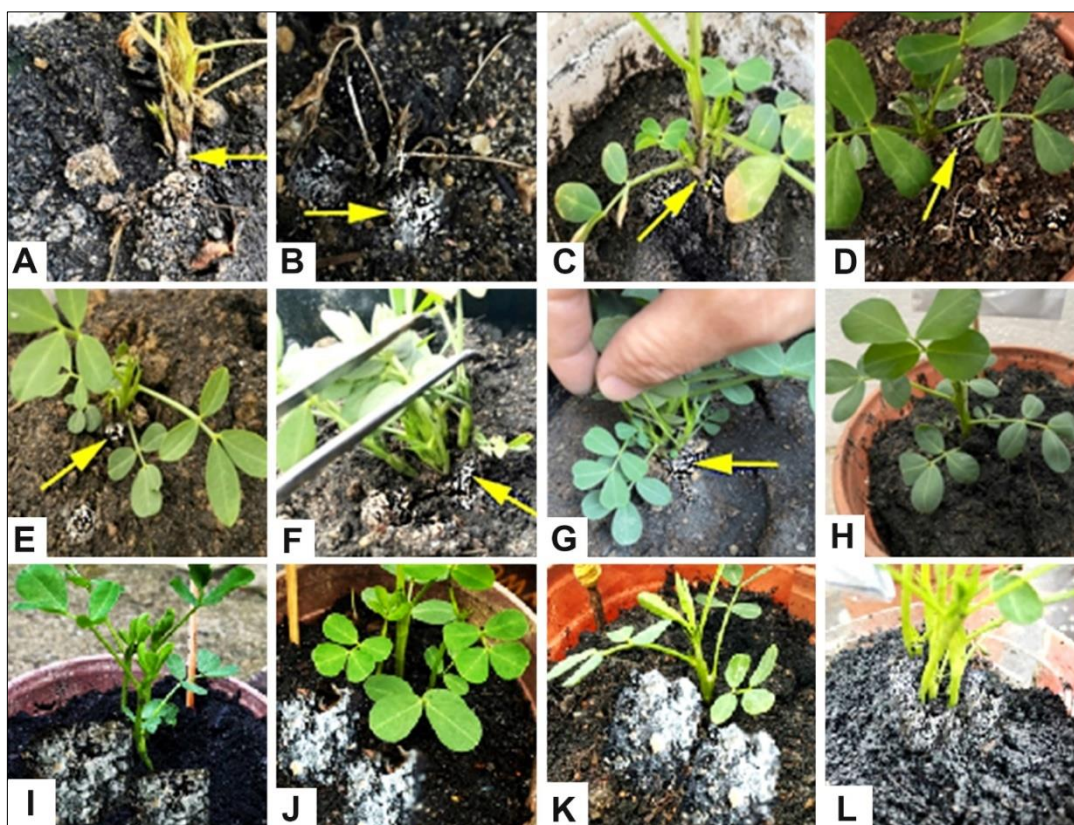
đến 1,67, trong khi đối chứng là từ 4,33 đến 5. Trong đó, các cá thể ở 3 dòng chuyển gen *syncodChi42-2* dưới sự điều khiển của promoter *Asy* đặc hiệu rễ có 100% cây khỏe mạnh, còn một số cá thể ở dòng chuyển gen *syncodChi42-1* và *Chi42* có vết bệnh trên thân nhưng chúng vẫn sinh trưởng bình thường.



Hình 3.40. Thử nghiệm hoạt tính kháng nấm *in vitro* đối với *S. rolfsii* của rễ cây lạc chuyển gen dùng vector pNHL19. PC: chitinase 42 kDa tinh sạch từ vi khuẩn làm đối chứng dương, NC: rễ lạc không chuyển gen làm đối chứng âm, WT2 và WT-3: *Chi42*, S1-2 và S1-3: *syncodChi42-1*, S2-2, S2-4 và S2-6: *syncodChi42-2*.



Hình 3.41. Thử nghiệm hoạt tính kháng nấm *in vitro* đối với *S. rolfsii* của rễ cây lạc chuyển gen dùng vector pNHL20. A: chitinase 42 kDa tinh sạch từ vi khuẩn làm đối chứng dương, B: môi trường không có chitinase làm đối chứng âm thứ 1, C: rễ lạc không chuyển gen làm đối chứng âm thứ 2, D: *syncodChi42-1* (S1A-15), E: *syncodChi42-2* (S2A-12) và F: *Chi42* (WTA-2).



Hình 3.42. Khả năng kháng *S. rolfsii* của các dòng lạc chuyển gen chitinase trong điều kiện *in vivo*. A-G và I-L: Các dòng lạc chuyển gen chitinase và đối chứng được trồng trên đất nhiễm nấm. A: cây lạc không chuyển gen nảy mầm từ hạt được sử dụng làm đối chứng âm thứ 1, B: cây lạc không chuyển gen từ nuôi cấy *in vitro* được sử dụng làm đối chứng âm thứ 2, C: dòng WTA-2 (pNHL20.1), D: dòng S1A-9 (pNHL20.2), E: dòng S1A-15 (pNHL20.2), F: dòng S2A-12 (pNHL20.3), G: dòng S2A-13 (pNHL20.3), I: dòng WT-2 (pNHL19.1), J: dòng S2-4 (pNHL19.3), K: dòng S2-6 (pNHL19.3), L: dòng S1-3 (pNHL19.2) và H: cây lạc không chuyển gen được trồng trên đất đã khử trùng. Các mũi tên chỉ ra vị trí mà nấm *S. rolfsii* phát triển.

Những kết quả này cho thấy Ta-CHI42 có hoạt tính kháng nấm đáng kể đối với *S. rolfsii* trong các dòng lạc chuyển gen được khảo sát. Kết quả nghiên cứu của luận án cũng chứng minh rằng đoạn peptide tín hiệu của gen amylase 3D ở lúa hoạt động hiệu quả trong rễ cây lạc chuyển gen chitinase. Chitinase tái tổ hợp (Ta-CHI42) của cây lạc được tiết ra ngoại bào để kháng lại *S. rolfsii*.

Theo các nghiên cứu được thực hiện bởi Rohini và cs (2001) [228] và Iqbal và cs (2012) [124], cây lạc chuyển gen chitinase vượt trội hơn so với đối chứng không chuyển gen về khả năng kháng *Cercospora arachidicola*, một loài nấm gây ra bệnh đốm lá sớm ở cây lạc. Prasad và cs (2013) đã phát hiện ra rằng chỉ có 0-10% hạt lạc chuyển gen *Ritch* bị nhiễm *Aspergillus flavus* trong các thử nghiệm nuôi cấy hạt ở điều kiện *in vitro* [213]. Ngoài 2 nghiên cứu trên, không có công bố liên quan nào được tìm thấy cho đến nay.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy các cây lạc chuyển gen biểu hiện chitinase tái tổ hợp có thể cung cấp một giải pháp thay thế cho vấn đề bệnh hại do nấm gây ra. Do đó, nghiên cứu của luận án góp thêm bằng chứng vào việc phát triển cây trồng chuyển gen với hoạt tính chitinase được cải thiện thông qua biểu hiện chitinase tái tổ hợp.

Bảng 3.10. Khả năng kháng *S. rolfisii* của các dòng lạc chuyển gen chitinase trồng trong điều kiện *in vivo*.

Vector	Gen	Dòng chuyển gen	Điểm
pNHL19	<i>syncodChi42-2</i>	S2-2	1,33 ^c
		S2-4	1,00 ^c
		S2-6	1,00 ^c
	<i>syncodChi42-1</i>	S1-1	1,67 ^{bc}
		S1-2	1,33 ^c
		S1-3	1,67 ^{bc}
	<i>Chi42</i>	WT-1	2,33 ^b
		WT-2	2,00 ^b
		WT-3	2,00 ^b
pNHL20	<i>syncodChi42-2</i>	S2A-12	1,00 ^c
		S2A-13	1,00 ^c
		S2A-14	1,00 ^c
	<i>syncodChi42-1</i>	S1A-9	1,00 ^c
		S1A-15	1,33 ^{bc}
	<i>Chi42</i>	WTA-2	1,67 ^c
		WTA-4	1,67 ^c
Đối chứng không chuyển gen		NC-1	4,33 ^a
		NC-2	5,00 ^a

Chú thích: Thang đánh giá bệnh: 1-5, trong đó 1: cây khỏe mạnh, 2: vết bệnh chỉ trên thân, 3: 25% cây có triệu chứng bệnh (héo, chết hoặc sắp chết), 4: 26-50% cây có triệu chứng và 5: > 50% cây có triệu chứng. NC1: cây lạc không chuyển gen nảy mầm từ hạt được sử dụng làm đối chứng âm thứ 1; NC2: cây lạc không chuyển gen từ nuôi cấy *in vitro* được sử dụng làm đối chứng âm thứ 2; Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ ra sự sai khác có ý nghĩa thống kê ở $p < 0,05$ (Duncan's test).

3.7. ĐẶC ĐIỂM SINH LÝ VÀ HÓA SINH CỦA CÂY LẠC CHUYỂN GEN SINH TRƯỞNG *IN VIVO*

3.7.1. Chọn giá thể thích hợp

Để cây *in vitro* sinh trưởng một cách bình thường trong điều kiện tự nhiên, chúng

cần có thời gian thích ứng thông qua giai đoạn sinh trưởng trên giá thể trong điều kiện nhà lưới hay vườn ươm. Đây là khâu cuối cùng và cũng là bước để đánh giá mức độ hiệu quả của một quy trình tái sinh. Vì vậy, việc lựa chọn một giá thể ra cây phù hợp có ý nghĩa đặc biệt quan trọng, giá thể thích hợp sẽ giúp rễ cây sinh trưởng nhanh chóng, làm tăng tỷ lệ sống khi ra cây.

Những cây lạc *in vitro* có đầy đủ thân, lá và rễ được trồng trên 6 loại giá thể khác nhau là vụn xơ dừa, đất mùn, giá thể đất mùn phối trộn xơ dừa (1:1), giá thể đất mùn phối trộn cát và đá vermiculite (1:1:1), giá thể đất mùn phối trộn trấu hun và cát (5:3:2) và giá thể đất mùn phối trộn trấu hun (7:3). Khả năng thích nghi và sinh trưởng của cây lạc được trình bày ở bảng 3.11 và hình 3.43. Việc chuyển cây con *in vitro* ra vườn ươm là một bước quan trọng trong nuôi cấy mô, cây *in vitro* được nuôi cấy trên môi trường thạch, độ ẩm cao và ổn định, khi chuyển ra vườn ươm trồng trên giá thể mới, độ ẩm không khí thấp dẫn đến cây con dễ bị héo và chết. Vì vậy, trong thời gian đầu chuyển cây cấy mô ra ngoài vườn ươm cần tưới phun sương đảm bảo độ ẩm cho cây con. Cây lạc *in vitro* sau khi trồng 1 tuần lá rụng dần, sau 2 tuần cây bắt đầu ra lá mới. Sau 3 tuần cây cho từ 2-3 cặp lá thật tùy vào từng loại giá thể. Ở những giá thể khác nhau thì sinh trưởng của cây cũng khác nhau. Cây trồng trên giá thể đất mùn có tỷ lệ sống thấp nhất, dao động từ 17,33-17,67%, tiếp đến là các giá thể xơ dừa, đất mùn phối trộn xơ dừa (1:1), đất mùn phối trộn trấu hun và cát (5:3:2) và đất mùn phối trộn trấu hun (7:3) có tỷ lệ sống dao động từ 18,67-38%, cây trồng trên các giá thể này sinh trưởng kém hơn so với cây trồng trên giá thể đất mùn phối trộn cát và đá vermiculite (1:1:1), chiều cao cây lần lượt 6,21, 6,31, 6,12 và 6,14 cm và số lá/cây là 2,52, 2,62, 3,23 và 2,48. Bên cạnh đó, cây còn có biểu hiện vàng lá, rễ ngắn và cây èo uột. Tỷ lệ sống của cây trên giá thể đất mùn phối trộn cát và đá vermiculite (1:1:1) cao nhất đạt 79-80,67% (Bảng 3.11). Cây con trên giá thể này có thời gian xuất hiện lá mới sớm, cây sinh trưởng tốt (chiều cao cây là 6,43-6,6 cm và số lá là 4,33-5 lá/cây), cây xanh, phát triển đọt mới, nhiều lá. Điều này cho thấy, giá thể này có độ thông thoáng và giữ ẩm thích hợp đến sự thích nghi của cây lạc trong giai đoạn đầu ở vườn ươm. Đá vermiculite rất nhẹ, không độc, không bị nấm mốc, khả năng giữ ẩm cực tốt, thoáng khí. Đây chính là cơ sở để chúng tôi lựa chọn giá thể gồm hỗn hợp đất : cát : vermiculite (1:1:1) làm nguyên liệu đưa cây lạc *in vitro* ra môi trường tự nhiên. Kết quả nghiên cứu này phù hợp với nghiên cứu của nhiều tác giả trước đây, Anuradha và cs (2006) đã sử dụng giá thể đất : đá vermiculite (1:1) để chuyển cây lạc chuyển gen mang vector p35SGUSINT từ *in vitro* ra môi trường *in vivo* [34]. Theo McKently

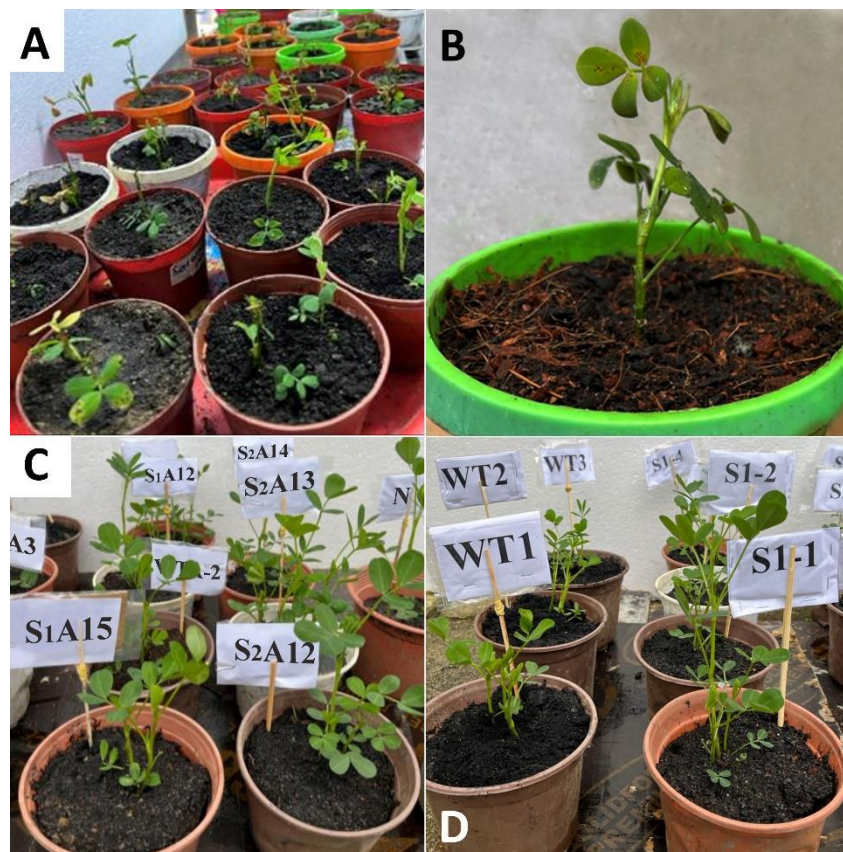
(1991), cây lạc *in vitro* được tái sinh từ phôi soma được chuyển sang nhà kính với giá thể gồm 1 than bùn: 2 đá perlite: 1 vermiculite [172].

Bảng 3.11. Ảnh hưởng của giá thể đến sinh trưởng của các dòng lạc chuyển gen sau 3 tuần chăm sóc.

Giá thể	Vector	Gen	Tỷ lệ sống (%)	Chiều cao cây (cm)	Số lá/cây (lá)
Xơ dừa	pNHL19	<i>Chi42</i>	19,00 ^a	6,17 ^a	2,00 ^a
		<i>syncodChi42-1</i>	18,67 ^a	6,23 ^a	2,33 ^a
		<i>syncodChi42-2</i>	19,00 ^a	6,20 ^a	2,33 ^a
	pNHL20	<i>Chi42</i>	19,00 ^a	6,20 ^a	2,67 ^a
		<i>syncodChi42-1</i>	19,00 ^a	6,33 ^a	2,33 ^a
		<i>syncodChi42-2</i>	18,67 ^a	6,23 ^a	2,67 ^a
Đối chứng không chuyển gen			19,00 ^a	6,07 ^a	2,00 ^a
Đất mùn	pNHL19	<i>Chi42</i>	17,33 ^a	6,20 ^a	2,33 ^a
		<i>syncodChi42-1</i>	17,33 ^a	6,07 ^a	2,33 ^a
		<i>syncodChi42-2</i>	17,67 ^a	6,17 ^a	2,67 ^a
	pNHL20	<i>Chi42</i>	17,67 ^a	6,27 ^a	2,33 ^a
		<i>syncodChi42-1</i>	17,33 ^a	6,27 ^a	2,67 ^a
		<i>syncodChi42-2</i>	17,67 ^a	6,37 ^a	3,00 ^a
Đối chứng không chuyển gen			17,33 ^a	6,10 ^a	2,33 ^a
Đất mùn : xơ dừa (1:1)	pNHL19	<i>Chi42</i>	26,00 ^a	6,27 ^a	2,33 ^a
		<i>syncodChi42-1</i>	25,67 ^a	6,27 ^a	2,33 ^a
		<i>syncodChi42-2</i>	26,00 ^a	6,33 ^a	3,00 ^a
	pNHL20	<i>Chi42</i>	26,00 ^a	6,27 ^a	2,33 ^a
		<i>syncodChi42-1</i>	26,00 ^a	6,33 ^a	3,00 ^a
		<i>syncodChi42-2</i>	25,67 ^a	6,43 ^a	3,00 ^a
Đối chứng không chuyển gen			26,00 ^a	6,27 ^a	2,33 ^a
Đất mùn : cát : đá vermiculite (1:1:1)	pNHL19	<i>Chi42</i>	79,00 ^a	6,43 ^a	4,33 ^a
		<i>syncodChi42-1</i>	79,67 ^a	6,43 ^a	4,67 ^a
		<i>syncodChi42-2</i>	79,67 ^a	6,43 ^a	4,67 ^a
	pNHL20	<i>Chi42</i>	79,00 ^a	6,43 ^a	4,67 ^a
		<i>syncodChi42-1</i>	80,67 ^a	6,50 ^a	4,67 ^a
		<i>syncodChi42-2</i>	80,00 ^a	6,60 ^a	5,00 ^a
Đối chứng không chuyển gen			79,67 ^a	6,43 ^a	4,33 ^a
Đất mùn :	pNHL19	<i>Chi42</i>	37,33 ^a	6,10 ^a	3,00 ^a

trấu hun : cát (5:3:2)		<i>syncodChi42-1</i>	36,67 ^a	6,17 ^a	3,33 ^a
		<i>syncodChi42-2</i>	37,00 ^a	6,10 ^a	3,33 ^a
		<i>Chi42</i>	36,67 ^a	6,10 ^a	3,00 ^a
	pNHL20	<i>syncodChi42-1</i>	37,33 ^a	6,10 ^a	3,33 ^a
		<i>syncodChi42-2</i>	38,00 ^a	6,17 ^a	3,33 ^a
	Đối chứng không chuyển gen		37,00 ^a	6,10 ^a	3,33 ^a
Đất mùn: trấu hun (7:3)		<i>Chi42</i>	29,00 ^a	6,10 ^a	2,67 ^a
	pNHL19	<i>syncodChi42-1</i>	29,00 ^a	6,10 ^a	2,67 ^a
		<i>syncodChi42-2</i>	29,00 ^a	6,10 ^a	2,67 ^a
		<i>Chi42</i>	28,67 ^a	6,10 ^a	2,00 ^a
	pNHL20	<i>syncodChi42-1</i>	29,67 ^a	6,20 ^a	2,67 ^a
		<i>syncodChi42-2</i>	29,67 ^a	6,27 ^a	2,67 ^a
Đối chứng không chuyển gen		28,33 ^a	6,10 ^a	2,00 ^a	

Chú thích: Các chữ cái khác nhau trên cùng một cột chỉ ra sự sai khác có ý nghĩa thống kê các trung bình mẫu (Duncan's test, $p < 0,05$).



Hình 3.43. Các dòng lạc chuyển gen sinh trưởng trong vườn ươm. A: cây lạc *in vitro* trên các loại giá thể khác nhau; B: cây lạc sau 15 ngày chăm sóc; C và D: sinh trưởng của cây lạc sau 50 ngày.

3.7.2. Đặc điểm sinh lý

3.7.2.1. Sinh trưởng của cây lạc

3.7.2.1.1. Thời gian sinh trưởng

Thời gian sinh trưởng và phát triển của cây lạc chuyển gen từ lúc trồng đến kết thúc ra hoa được trình bày ở bảng 3.12. Thời gian từ lúc trồng đến khi có 5 lá thật đầu tiên của lạc dao động từ 17-20 ngày. Trong đó, các dòng lạc chuyển gen *syncodChi42-2* từ vector pNHL20 có thời gian ra 5 lá thật đầu tiên ngắn nhất khoảng 17-18 ngày. Điều đó chứng tỏ các dòng này có khả năng thích nghi tốt và có tốc độ sinh trưởng nhanh hơn so với các dòng còn lại (sớm nhất là 19 ngày). Sau 20-30 ngày, cây bắt đầu xuất hiện cành cấp 1; từ giai đoạn này, lạc sinh trưởng mạnh và chuẩn bị ra hoa. Trong đó, các dòng chuyển gen *syncodChi42-2* từ vector pNHL20 có thời gian xuất hiện cành cấp 1 ngắn nhất từ 25-27 ngày, tiếp đến là các dòng chuyển gen *syncodChi42-2* từ vector pNHL19 cần 27 ngày, các dòng chuyển gen *Chi42* từ cả 2 vector pNHL19 và pNHL20 đều có thời gian xuất hiện cành cấp 1 chậm nhất lên tới 30 ngày.

Bảng 3.12. Thời gian sinh trưởng và phát triển của các dòng lạc chuyển gen chitinase.

Vector	Gen	Dòng chuyển gen	Thời gian (ngày)				Tổng TGST
			5 lá thật	Xuất hiện cành cấp 1	Bắt đầu ra hoa	Kết thúc ra hoa	
pNHL19	<i>syncodChi42-2</i>	S2-2	18	27	57	77	142
		S2-4	18	27	59	77	140
		S2-6	19	27	59	75	140
	<i>syncodChi42-1</i>	S1-1	19	30	59	75	144
		S1-2	20	29	57	77	142
		S1-3	20	30	57	77	142
	<i>Chi42</i>	WT-1	18	30	59	77	144
		WT-2	19	30	59	77	142
		WT-3	18	30	58	77	144
pNHL20	<i>syncodChi42-2</i>	S2A-12	18	27	53	75	136
		S2A-13	18	27	50	72	133
		S2A-14	17	25	50	72	133
	<i>syncodChi42-1</i>	S1A-9	18	29	57	77	138
		S1A-15	18	29	55	77	138
	<i>Chi42</i>	WTA-2	20	30	59	77	142
WTA-4		18	30	59	78	142	
Đối chứng không chuyển gen	NC-1	NC-1	15	20	43	64	122
		NC-2	20	30	58	77	145

Chú thích: NC1: cây lạc không chuyển gen được gieo từ hạt, NC2: cây lạc không chuyển gen có nguồn gốc *in vitro*.

Thời gian từ lúc trồng đến khi xuất hiện nụ hoa đầu tiên của các dòng lạc chuyển gen dao động từ 43-59 ngày. Trong đó, các dòng chuyển gen sử dụng vector pNHL20 có thời gian ra hoa sớm từ 50-53 ngày (*syncodChi42-2*) và 55-57 ngày (*syncodChi42-1*). Các dòng chuyển gen *Chi42* có thời gian bắt đầu ra hoa chậm hơn và tương đương nhau ở cả hai loại promoter là 58-59 ngày. Thời gian từ lúc xuất hiện cành cấp 1 đến khi ra nụ hoa đầu tiên của 16 dòng chuyển gen dao động từ 23-32 ngày.

Thời gian từ trồng đến kết thúc ra hoa của các dòng lạc từ 122-144 ngày. Giai đoạn ra hoa kéo dài 16-22 ngày, trong đó các dòng *syncodChi42-2* từ vector pNHL20 có thời gian ra hoa dài nhất (khoảng 22 ngày). So với đối chứng không chuyển gen được gieo từ hạt, tổng thời gian sinh trưởng của các dòng chuyển gen dài hơn 22 ngày, riêng cây lạc không chuyển gen từ nuôi cấy *in vitro* có tổng thời gian sinh trưởng hơn cây trồng từ hạt là 23 ngày. Theo Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm - Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam, giống lạc L14 có thời gian sinh trưởng 120-135 ngày (vụ xuân) [19].

3.7.2.1.2. Chiều cao cây

Sinh trưởng và phát triển của cây trồng là một quá trình sinh lý tổng hợp. Sự biến đổi về lượng là cơ sở của sự biến đổi về chất, quá trình tăng lên về kích thước, khối lượng và thể tích của các cơ quan liên quan đến sự hình thành các yếu tố cấu tạo mới, như các thành phần mới của tế bào, tế bào mới, cơ quan mới là tiền đề cho sự phát triển và ngược lại.

Kết quả khảo sát chiều cao thân chính của lạc chuyển gen ở bảng 3.13 cho thấy chiều cao thân tăng ở tất cả các giai đoạn sinh trưởng và phát triển, tốc độ tăng trưởng lớn nhất là từ giai đoạn 5 lá thật đến lúc bắt đầu ra hoa (7,8-9,3 cm) nhưng đạt cao nhất ở giai đoạn thu hoạch. Ở thời điểm thu hoạch, cây đối chứng từ nuôi cấy *in vitro* có chiều cao thấp hơn cả (24,1 cm), tiếp đến là các dòng chuyển gen *Chi42* dưới sự điều khiển của promoter dp35S (26-26,8 cm), các dòng chuyển gen *syncodChi42-1* được điều khiển bởi cả 2 promoter (29,3-30 cm), tuy nhiên sự sai khác giữa 6 dòng chuyển gen này không có ý nghĩa thống kê ($p > 0,05$). Các dòng chuyển gen *syncodChi42-2* dưới sự điều khiển của promoter pAsy có chiều cao cây cao nhất ở tất cả các giai đoạn sinh trưởng. Trong đó, dòng S2A-12 có chiều cao cao nhất từ giai đoạn ra hoa rộ đến thu hoạch (lần lượt là 22, 25,2 và 33 cm) ($p > 0,05$).

Chiều cao của các cây lạc ở giai đoạn 5 lá thật không có sự sai khác đáng kể. Nguyên nhân có thể do giai đoạn trước 5 lá thật, cây lạc từ môi trường *in vitro* chuyển sang giá thể mới bắt đầu thích nghi và tập trung hình thành lá mới. Kể từ giai đoạn 5 lá thật đến lúc ra hoa, chiều cao cây tăng với tốc độ nhanh hơn, dẫn đến có sự sai khác ở các dòng chuyển gen.

Bảng 3.13. Chiều cao thân chính của các dòng lạc chuyển gen ở các giai đoạn sinh trưởng và phát triển.

Vector	Gen	Dòng chuyển gen	Chiều cao thân chính (cm)			
			5 lá thật	Ra hoa rộ	Kết thúc ra hoa	Thu hoạch
pNHL19	<i>syncodChi42-2</i>	S2-2	10,6 ^a	17,8 ^{de}	20,8 ^d	29,3 ^c
		S2-4	9,8 ^{ab}	17,8 ^{de}	23,0 ^{bc}	30,0 ^{bc}
		S2-6	10,6 ^a	17,6 ^{de}	23,0 ^{bc}	29,8 ^c
	<i>syncodChi42-1</i>	S1-1	10,6 ^a	17,4 ^e	20,6 ^b	28,1 ^{cd}
		S1-2	9,9 ^{ab}	16,8 ^f	21,8 ^{cd}	27,9 ^d
		S1-3	9,3 ^b	17,4 ^e	20,5 ^d	29,0 ^c
	<i>Chi42</i>	WT-1	9,7 ^{ab}	15,9 ^{fg}	20,6 ^d	26,1 ^e
		WT-2	10,0 ^{ab}	15,9 ^{fg}	20,4 ^d	26,0 ^e
		WT-3	9,6 ^{ab}	15,8 ^{fg}	20,8 ^d	26,8 ^{de}
pNHL20	<i>syncodChi42-2</i>	S2A-12	10,1 ^{ab}	22,0 ^a	25,2 ^a	33,0 ^a
		S2A-13	10,0 ^{ab}	20,0 ^{bc}	24,6 ^{ab}	31,6 ^{ab}
		S2A-14	10,1 ^{ab}	21,2 ^{ab}	24,6 ^{ab}	32,8 ^a
	<i>syncodChi42-1</i>	S1A-9	9,6 ^{ab}	18,4 ^{de}	21,6 ^{cd}	29,6 ^c
		S1A-15	9,8 ^{ab}	19,6 ^c	23,6 ^{ab}	29,3 ^c
	<i>Chi42</i>	WTA-2	9,6 ^{ab}	16,8 ^f	21,4 ^{cd}	29,7 ^c
WTA-4		9,1 ^b	18,4 ^{de}	22,2 ^{cd}	28,8 ^c	
Đối chứng không chuyển gen*			7,2 ^c	15,0 ^{fg}	18,2 ^e	24,1 ^e

Chú thích: *Có nguồn gốc từ nuôi cấy *in vitro* (chú thích này dùng chung cho các bảng 3.13-3.19).

Theo nghiên cứu của Lê Như Cương và cs (2019), chiều cao thân chính phụ thuộc vào tốc độ sinh trưởng, cây càng cao càng thể hiện cây sinh trưởng, phát triển tốt, có năng suất cao [2]. Ngược lại với kết quả của chúng tôi về sự sinh trưởng và phát triển của cây lạc chuyển gen, Zeng và cs (2016) không tìm thấy sự sai khác đáng kể về chiều cao cây khi chuyển 2 gen: *McCHIT1* mã hóa chitinase và *PAT* kháng thuốc trừ cỏ vào cây lúa [297]. Sự biểu hiện quá mức của gen chitinase *CmCHI* trong đậu tương chuyển gen cũng không cho thấy có tác dụng phụ nào đối với sinh trưởng và phát triển của cây [294].

3.7.2.1.3. Số cành trên cây

Thân và cành là hai bộ phận tạo nên hình dáng của cây, đồng thời là nơi ra hoa, kết quả tạo nên năng suất lạc sau này. Khi cây có 2-3 lá thật, tại nách lá mầm xuất hiện

hai cành mầm, đây là cặp cành cho năng suất và cũng chính là nơi sinh ra cặp cành cấp 2. Cặp cành cấp 1 thứ nhất và thứ 2 cho 35% tổng số hoa trên cây. Kết quả nghiên cứu số cành trên cây của các dòng lạc chuyển gen được trình bày ở bảng 3.14.

Bảng 3.14. Số cành cấp 1 và tổng số cành trên cây của các dòng lạc chuyển gen chitinase.

Vector	Gen	Dòng chuyển gen	Số cành cấp 1/cây		Tổng số cành/cây	
			Ra hoa rộ	Thu hoạch	Ra hoa rộ	Thu hoạch
pNHL19	<i>syncodChi42-2</i>	S2-2	3,4 ^{ab}	4,6 ^a	4,8 ^{ab}	6,4 ^a
		S2-4	3,6 ^a	4,8 ^a	5,0 ^a	6,4 ^a
		S2-6	3,4 ^{ab}	4,8 ^a	4,8 ^{ab}	6,4 ^a
	<i>syncodChi42-1</i>	S1-1	3,4 ^{ab}	4,6 ^a	4,8 ^{ab}	6,0 ^{ab}
		S1-2	3,6 ^a	4,4 ^a	5,0 ^a	6,2 ^{ab}
		S1-3	3,2 ^{ab}	4,4 ^a	4,8 ^{ab}	6,4 ^a
	<i>Chi42</i>	WT-1	3,2 ^{ab}	4,4 ^a	4,8 ^{ab}	6,0 ^{ab}
		WT-2	3,2 ^{ab}	4,4 ^a	5,0 ^a	6,2 ^{ab}
		WT-3	3,6 ^a	4,6 ^a	4,8 ^{ab}	6,2 ^{ab}
pNHL20	<i>syncodChi42-2</i>	S2A-12	3,6 ^a	4,8 ^a	5,0 ^a	6,8 ^a
		S2A-13	3,6 ^a	4,6 ^a	5,0 ^a	6,2 ^{ab}
		S2A-14	3,4 ^{ab}	4,8 ^a	5,0 ^a	6,6 ^a
	<i>syncodChi42-1</i>	S1A-9	3,2 ^{ab}	4,4 ^a	5,0 ^a	6,0 ^b
		S1A-15	3,4 ^{ab}	4,4 ^a	5,0 ^a	6,2 ^{ab}
	<i>Chi42</i>	WTA-2	3,6 ^a	4,4 ^a	5,0 ^a	6,4 ^{ab}
		WTA-4	3,2 ^{ab}	4,6 ^a	5,0 ^a	6,2 ^{ab}
	Đối chứng không chuyển gen			2,8 ^b	3,4 ^b	4,4 ^b

Bảng 3.14 cho thấy ở các dòng lạc chuyển gen không có sự khác biệt về số cành cấp 1 và tổng số cành trên cây ở giai đoạn ra hoa rộ và thu hoạch. Ở giai đoạn ra hoa rộ, số cành ở các dòng chuyển gen dao động từ 2,8-3,6 (cành cấp 1) và từ 4,4- 5 (tổng số cành), cao hơn đối chứng không chuyển gen. Ở giai đoạn thu hoạch, số cành cấp 1 và tổng số cành của các dòng chuyển gen cũng cao hơn đối chứng nhưng giữa các dòng này không có sự sai khác đáng kể ($p>0,05$). Dòng S2A-12 có tổng số cành cao nhất ở giai đoạn thu hoạch (6,8), tiếp đến là dòng S2A-14 (6,6), 3 dòng *syncodChi42-2* và WTA-2 (6,4), các dòng còn lại có tổng số cành dao động từ 6-6,2 cành/cây và thấp hơn cả là đối chứng (5,6).

3.7.2.1.4. Số lá trên cây

Đối với cây trồng nói chung và cây lạc nói riêng, lá là một bộ phận có ý nghĩa quan trọng, làm nhiệm vụ quang hợp để tổng hợp chất hữu cơ cung cấp cho quá trình sinh trưởng và phát triển của cây, đồng thời nó cũng là bộ phận chủ yếu để thoát hơi nước, xúc tiến các quá trình sinh lý, hóa sinh xảy ra trong cơ thể thực vật. Do đó, đời sống của lá có liên quan đến năng suất. Số lá trên cây trong nghiên cứu này được theo dõi từ khi cây lạc bắt đầu ra hoa đến lúc thu hoạch. Kết quả được trình bày ở bảng 3.15.

Ở giai đoạn bắt đầu ra hoa, số lá trên cây của các dòng lạc chuyển gen đều cao hơn đối chứng, dao động từ 10,8-13. Cao nhất là các dòng S2A-12, S2A-14 và WTA-3, tiếp đến là các dòng S2A-13, S1A-15, WTA-2 và S2-4 (12,8), các dòng còn lại có số lá trên cây dao động từ 10,8-12,4, và thấp nhất là đối chứng (9,8). Tuy nhiên, mức độ sai khác về số lá ở các dòng lạc chuyển gen không rõ ràng ($p > 0,05$). Ở giai đoạn ra hoa rộ, số lá trên cây của các dòng chuyển gen dao động từ 14,4-16,6, trong đó cao nhất là dòng S2A-12 (16,6) và thấp nhất là đối chứng (13). Đến giai đoạn kết thúc ra hoa, các dòng chuyển gen *syncodChi42-2* sử dụng promoter Asy có số lá trên cây cao nhất từ 18-18,4 và thấp nhất vẫn là đối chứng (15,6). Vào giai đoạn thu hoạch, số lá trên cây của các dòng chuyển gen đều cao hơn đối chứng, dao động từ 20-22,2 lá/cây. Trong đó, dòng S2A-12 có số lá nhiều hơn cả (22,2) và đây cũng là dòng có các chỉ tiêu sinh trưởng và năng suất sau này cao hơn các dòng chuyển gen khác.

Theo Lê Như Cương và cs (2019) số lá phụ thuộc vào tốc độ sinh trưởng, chiều cao thân và số cành của cây, số lá càng nhiều càng thể hiện cây sinh trưởng và phát triển tốt, có nhiều hoa [2]. Tuy nhiên, đối với cây chuyển gen, một số nghiên cứu như Chan và cs (2012) cho thấy rằng sự biểu hiện quá mức của *CBF3* ở *Arabidopsis thaliana* có tác động tiêu cực đến sinh trưởng và phát triển, bao gồm làm chậm ra hoa và tạo quả, giảm số lượng lá, đường kính hoa, chiều cao cây, khối lượng khô và năng suất hạt so với cây không chuyển gen [62]. Điều này cho thấy ảnh hưởng của gen ngoại lai đến sự sinh trưởng và phát triển của cây chuyển gen là một vấn đề phức tạp, cần có những nghiên cứu sâu hơn để giải đáp hiện tượng này.

Bảng 3.15. Số lá trên cây của các dòng lạc chuyển gen chitinase.

Vector	Gen	Dòng chuyển gen	Số lá trên cây			
			Bắt đầu ra hoa	Ra hoa rộ	Kết thúc ra hoa	Thu hoạch
pNHL19	<i>syncodChi42-2</i>	S2-2	12,4 ^{ab}	15,2 ^{cd}	17,2 ^{bc}	21,2 ^b
		S2-4	12,8 ^{ab}	15,8 ^{ab}	17,8 ^a	21,8 ^{ab}
		S2-6	12,6 ^{ab}	15,6 ^b	17,6 ^{ab}	21,6 ^{ab}
	<i>syncodChi42-1</i>	S1-1	12,4 ^{ab}	15,4 ^{bc}	17,4 ^b	21,4 ^{ab}
		S1-2	12,4 ^{ab}	15,4 ^{bc}	17,4 ^b	21,4 ^{ab}
		S1-3	12,4 ^{ab}	15,6 ^b	17,6 ^{ab}	21,6 ^{ab}
	<i>Chi42</i>	WT-1	11,0 ^c	14,4 ^d	16,4 ^{cd}	20,0 ^{de}
		WT-2	10,8 ^c	14,6 ^{cd}	16,4 ^{cd}	20,0 ^{de}
		WT-3	11,2 ^c	14,6 ^{cd}	16,4 ^{cd}	20,2 ^{cd}
pNHL20	<i>syncodChi42-2</i>	S2A-12	13,0 ^a	16,6 ^a	18,4 ^a	22,2 ^a
		S2A-13	12,8 ^{ab}	15,8 ^{ab}	18,0 ^a	22,0 ^{ab}
		S2A-14	13,0 ^a	15,8 ^{ab}	18,2 ^a	22,2 ^a
	<i>syncodChi42-1</i>	S1A-9	12,0 ^b	15,4 ^{bc}	16,8 ^{bc}	20,8 ^{cd}
		S1A-15	12,8 ^{ab}	15,4 ^{bc}	17,0 ^{bc}	21,0 ^c
	<i>Chi42</i>	WTA-2	12,8 ^{ab}	15,8 ^{ab}	17,8 ^a	21,8 ^{ab}
		WTA-4	12,0 ^b	14,8 ^{cd}	17,0 ^{bc}	20,8 ^{cd}
Đối chứng không chuyển gen			9,8 ^d	13,0 ^e	15,6 ^d	19,2 ^e

3.7.2.2. Cường độ thoát hơi nước

Sự thoát hơi nước ở lá tạo ra động lực cho của quá trình hút nước và làm giảm nhiệt độ của lá giúp cho lá ít bị đốt nóng bởi ánh sáng mặt trời, đặc biệt khi quá trình thoát hơi nước diễn ra, khí khổng mở tạo điều kiện cho khí CO₂ dễ khuếch tán vào bên trong và O₂ thoát ra bên ngoài giúp cho quá trình quang hợp của cây diễn ra thuận lợi. Đây là cơ sở để tăng sinh khối và là tiền đề để tăng năng suất cây trồng. Kết quả nghiên cứu cường độ thoát hơi nước ở lá được trình bày trong bảng 3.16.

Bảng 3.16. Cường độ thoát hơi nước ở lá của các dòng lạc chuyển gen chitinase.

Vector	Gen	Dòng chuyển gen	Cường độ thoát hơi nước ở lá (mg/dm ² /h)		
			5 lá thật	Ra hoa rộ-đâm tia	Vào quả chắc
pNHL19	<i>syncodChi42-2</i>	S2-2	0,30 ^{de}	1,15 ^{cd}	0,56 ^{fg}
		S2-4	0,68 ^a	1,24 ^{bc}	0,55 ^{fg}
		S2-6	0,31 ^{de}	1,24 ^{bc}	0,62 ^{ef}
	<i>syncodChi42-1</i>	S1-1	0,29 ^{de}	1,24 ^{bc}	0,69 ^{cd}
		S1-2	0,28 ^{de}	1,12 ^{cd}	0,65 ^d
		S1-3	0,29 ^{de}	1,28 ^b	0,64 ^{de}
	<i>Chi42</i>	WT-1	0,24 ^{de}	1,11 ^{cd}	0,74 ^c
		WT-2	0,36 ^{de}	1,10 ^{cd}	0,66 ^d
		WT-3	0,41 ^{cd}	1,02 ^d	0,78 ^c
pNHL20	<i>syncodChi42-2</i>	S2A-12	0,74 ^a	1,46 ^a	0,99 ^a
		S2A-13	0,62 ^a	1,38 ^{ab}	0,92 ^{ab}
		S2A-14	0,49 ^{bc}	1,46 ^a	0,91 ^{ab}
	<i>syncodChi42-1</i>	S1A-9	0,48 ^{bc}	1,14 ^{cd}	0,98 ^a
		S1A-15	0,41 ^{cd}	1,35 ^{ab}	0,86 ^b
	<i>Chi42</i>	WTA-2	0,36 ^{de}	1,27 ^{bc}	0,51 ^{ef}
WTA-4		0,28 ^{de}	1,12 ^{cd}	0,56 ^{fg}	
Đối chứng không chuyển gen			0,21 ^e	0,10 ^d	0,50 ^g

Cường độ thoát hơi nước ở lá của các dòng lạc chuyển gen qua các giai đoạn sinh trưởng và phát triển đều cao hơn so với đối chứng. Cường độ thoát hơi nước ở lá đạt giá trị thấp ở thời kỳ trước ra hoa và đạt cực đại ở thời kỳ ra hoa. Thời kỳ trước khi ra hoa, các dòng *syncodChi42-2* dưới sự điều khiển của promoter Asy có cường độ thoát hơi nước cao nhất, dao động từ 0,49-0,74 mg/dm²/h, tiếp đến là các dòng *syncodChi42-2* dưới sự điều khiển của promoter 35S (0,30-0,68 mg/dm²/h), các dòng còn lại dao động từ 0,23-0,48 mg/dm²/h và thấp nhất là đối chứng (0,21 mg/dm²/h). Bước sang thời kỳ nở hoa, cường độ thoát hơi nước ở lá tăng mạnh, các dòng *syncodChi42-2* dùng vector pNHL20 đạt giá trị cao nhất từ 1,38-1,46 mg/dm²/h, thấp nhất trong các dòng chuyển gen là S1-2 và WTA-4 (1,12 mg/dm²/h). Đến giai đoạn quả vào chắc, cường độ thoát hơi nước ở lá giảm mạnh, trong đó cao nhất là ở các dòng *syncodChi42-2* dùng cấu trúc pNHL19 (0,73-0,98 mg/dm²/h). Đây cũng là các dòng lạc có chiều cao cây, số cành trên cây, số lá trên cây cao nhất trong các dòng được nghiên cứu.

3.7.2.3. Hàm lượng chlorophyll

Trong bộ máy quang hợp, hệ sắc tố của thực vật là nhân tố duy nhất có khả năng hấp thụ năng lượng ánh sáng mặt trời và biến năng lượng hấp thụ ấy thành dạng năng lượng hóa học được thực hiện trong quá trình quang hợp. Vì vậy, hiệu suất quang hợp liên quan mật thiết với hàm lượng các dạng sắc tố trong cây, đặc biệt là hàm lượng Chl [240]. Hàm lượng Chl trong lá là một chỉ số quan trọng của quá trình quang hợp, trạng thái dinh dưỡng và có liên quan trực tiếp đến năng suất cây trồng, do đó, hàm lượng Chl cao là cơ sở cho thấy sự cải thiện tốc độ quang hợp của lá [236]. Trong đó, Chla và Chlb đóng vai trò là các điểm tiếp nhận ánh sáng trong quá trình quang hợp. Kết quả nghiên cứu về hàm lượng Chl của các dòng lạc chuyển gen chitinase qua các giai đoạn sinh trưởng được trình bày ở bảng 3.17. Hàm lượng Chla và Chlb trong lá của các dòng chuyển gen chitinase tăng dần từ thời kỳ trước ra hoa (5 lá thật) đến khi ra hoa và đạt cao nhất vào thời kỳ ra hoa rộ-đâm tia. Hàm lượng Chl tăng ở những thời kỳ đầu có liên quan đến quá trình tổng hợp chất hữu cơ cho cây, tích lũy vật chất cho quá trình tạo quả.

Giai đoạn 5 lá thật: Hàm lượng Chla ở các dòng chuyển gen dao động từ 0,18-0,24 mg/g lá tươi và đều cao hơn đối chứng (0,15 mg/g lá). Trong các dòng chuyển gen, S2A-12 có Chla cao nhất (0,24 mg/g lá), tiếp đến là S2A-14, S2A-13, S2-6, S2-4 (0,23 mg/g lá), WTA-12 (0,22 mg/g lá), các dòng còn lại dao động từ 0,19-0,22 mg/g lá và thấp nhất là WT-1 (0,18 mg/g lá). Ở giai đoạn này, hàm lượng Chlb của các dòng chuyển gen dao động từ 0,89-1,1 mg/g lá, trong đó cao nhất vẫn là dòng S2A-12 và thấp nhất là đối chứng (0,86 mg/g lá).

Giai đoạn ra hoa rộ-đâm tia: Hàm lượng Chla và Chlb trong lá của 16 dòng chuyển gen dao động từ 0,49-0,54 mg/g lá (Chla) và 1,05-1,29 mg/g lá (Chlb), cao hơn đối chứng (Chla: 0,45 mg/g lá và Chlb: 0,98 mg/g lá). Trong đó, cao nhất vẫn là dòng S2A-12 về cả hàm lượng Chla và Chlb, đây cũng là dòng có cường độ thoát hơi nước ở lá cao nhất trong các dòng chuyển gen ở giai đoạn này. Điều này thúc đẩy sự sinh trưởng mạnh về cơ quan dinh dưỡng dẫn đến chiều cao cây, số lá trên cây, số cành cấp 1 và tổng số cành trên cây ở dòng S2A-12 cao hơn so với các dòng chuyển gen còn lại. Ngoài ra, kết quả ở bảng 3.17 còn cho thấy, hàm lượng Chla và Chlb ở các dòng chuyển gen đạt cực đại ở giai đoạn ra hoa rộ-đâm tia bởi đây là giai đoạn cây lạc ra nhiều hoa cùng lúc và bắt đầu đâm tia xuống đất để hình thành quả, hạt nên cần nhiều chất hữu cơ hơn.

Giai đoạn quả vào chắt: Hàm lượng Chla và Chlb ở giai đoạn này thấp hơn so với giai đoạn ra hoa rộ-đâm tia. Chla và Chlb ở các dòng chuyển gen tương ứng là 0,35-0,49 mg/g lá và 0,83-1,09 mg/g lá, cao hơn đối chứng là 0,33 mg/g lá (Chla) và 0,73 mg/g lá (Chlb).

Bảng 3.17. Hàm lượng chlorophyll của các dòng lạc chuyển gen chitinase.

Vector	Gen	Dòng chuyển gen	Hàm lượng Chl (mg/g) ở lá					
			5 lá thật		Ra hoa rộ-đâm tia		Quả vào chắt	
			Chla	Chlb	Chla	Chlb	Chla	Chlb
pNHL19	<i>syncodChi42-2</i>	S2-2	0,22 ^c	0,90 ^f	0,50 ^b	1,09 ^e	0,37 ^c	0,85 ^e
		S2-4	0,23 ^b	0,95 ^{de}	0,52 ^a	1,20 ^b	0,41 ^b	1,06 ^b
		S2-6	0,23 ^b	0,93 ^e	0,54 ^a	1,12 ^d	0,38 ^c	0,93 ^c
	<i>syncodChi42-1</i>	S1-1	0,19 ^d	0,89 ^f	0,49 ^b	1,07 ^e	0,35 ^d	0,87 ^e
		S1-2	0,20 ^d	0,89 ^f	0,50 ^b	1,08 ^e	0,36 ^d	0,87 ^e
		S1-3	0,20 ^d	0,889 ^f	0,50 ^b	1,08 ^e	0,36 ^d	0,87 ^e
	<i>Chi42</i>	WT-1	0,18 ^d	0,90 ^f	0,51 ^b	1,05 ^e	0,40 ^b	0,86 ^e
		WT-2	0,19 ^d	0,89 ^f	0,51 ^b	1,05 ^e	0,39 ^c	0,85 ^e
		WT-3	0,19 ^d	0,89 ^f	0,49 ^b	1,08 ^e	0,35 ^d	0,87 ^e
pNHL20	<i>syncodChi42-2</i>	S2A-12	0,24 ^a	1,10 ^a	0,54 ^a	1,29 ^a	0,49 ^a	1,09 ^a
		S2A-13	0,23 ^b	1,01 ^b	0,54 ^a	1,17 ^c	0,45 ^a	1,07 ^b
		S2A-14	0,23 ^b	1,04 ^b	0,54 ^a	1,23 ^b	0,48 ^a	1,04 ^b
	<i>syncodChi42-1</i>	S1A-9	0,20 ^d	0,98 ^c	0,50 ^b	1,14 ^d	0,38 ^c	1,01 ^c
		S1A-15	0,22 ^c	1,01 ^b	0,53 ^a	1,19 ^c	0,45 ^a	0,99 ^c
	<i>Chi42</i>	WTA-2	0,22 ^b	0,93 ^e	0,54 ^a	1,12 ^d	0,38 ^c	0,83 ^e
WTA-4		0,21 ^c	0,98 ^c	0,51 ^b	1,17 ^c	0,39 ^c	1,02 ^c	
Đối chứng không chuyển gen			0,15 ^e	0,86 ^f	0,45 ^c	0,98 ^f	0,33 ^d	0,73 ^f

Nhìn chung, kết quả ở bảng 3.16 và 3.17 cho thấy các dòng lạc chuyển gen chitinase đều có cường độ quang hợp, hàm lượng Chla và Chlb ở các giai đoạn sinh trưởng và phát triển cao hơn đối chứng. Kết quả về hàm lượng Chl trong cây lạc chuyển gen tương tự như nghiên cứu của Hong và cs (2006), cây *A. thaliana* có gen chitinase ngoại lai (*CAChi2*) biểu hiện mạnh, có hàm lượng Chl cao hơn đối chứng không chuyển gen [120]. Các nghiên cứu khác về biểu hiện chitinase tái tổ hợp ở cà chua và *A. thaliana* cũng cho kết quả tương tự như ở luận án này [59], [89], [251]. Như vậy, sự gia tăng một số chỉ tiêu sinh lý quan trọng ở cây chuyển gen có thể liên quan đến cơ chế bảo vệ thực vật kháng lại mầm bệnh [164], [221]. Chitinase trong cây chuyển gen hỗ trợ sự phát triển của thực vật bằng cách cải thiện sức bền của cây đối

với các tác nhân gây bệnh và stress phi sinh học từ đó góp phần làm tăng năng suất cây trồng [184].

3.7.2.4. Các yếu tố cấu thành năng suất

Năng suất lạc do nhiều yếu tố quyết định như số hoa/cây, tỷ lệ hoa hữu hiệu/cây, số quả chắc/cây, khối lượng trung bình 100 quả, khối lượng trung bình 100 hạt. Đối với người trồng lạc vì mục đích kinh tế thì mật độ hoa, tỷ lệ hoa hữu hiệu và số lượng quả chắc/cây là rất quan trọng, nó thể hiện được năng suất của cây lạc cũng như mức lợi nhuận đạt được trong một vụ mùa. Kết quả về các yếu tố cấu thành năng suất của các dòng lạc chuyển gen được trình bày ở bảng 3.18 và hình 3.44.

Bảng 3.18. Các yếu tố cấu thành năng suất của các dòng lạc chuyển gen chitinase.

Vector	Gen	Dòng chuyển gen	Số hoa/cây	Tỷ lệ hoa hữu hiệu (%)	Số quả chắc/cây	KL 100 quả (g)	KL 100 hạt (g)
pNHL19	<i>syncodChi42-2</i>	S2-2	25,6 ^{cd}	33,6 ^b	8,6 ^c	114,84 ^{bc}	35,22 ^{cd}
		S2-4	25,8 ^{cd}	34,9 ^{ab}	9,0 ^{bc}	115,48 ^b	36,22 ^c
		S2-6	25,8 ^{cd}	32,5 ^b	8,4 ^{cd}	115,32 ^b	35,62 ^{cd}
	<i>syncodChi42-1</i>	S1-1	25,4 ^{de}	33,1 ^b	8,4 ^{cd}	112,58 ^{bc}	33,66 ^{ef}
		S1-2	25,4 ^{de}	33,0 ^b	8,4 ^{cd}	114,88 ^{bc}	34,54 ^{de}
		S1-3	25,4 ^{de}	33,9 ^{ab}	8,6 ^c	114,70 ^{bc}	34,54 ^{de}
	<i>Chi42</i>	WT-1	24,6 ^{ef}	35,0 ^{ab}	8,6 ^c	111,66 ^c	33,06 ^{fg}
		WT-2	24,8 ^{ef}	33,1 ^b	8,2 ^d	111,86 ^c	33,10 ^{fg}
		WT-3	24,6 ^{ef}	34,2 ^{ab}	8,4 ^d	111,68 ^c	32,28 ^{gh}
pNHL20	<i>syncodChi42-2</i>	S2A-12	28,0 ^a	37,8 ^a	10,6 ^a	119,50 ^a	38,74 ^a
		S2A-13	27,2 ^{ab}	34,5 ^{ab}	9,4 ^{bc}	115,86 ^b	37,92 ^{ab}
		S2A-14	27,8 ^a	34,5 ^{ab}	9,6 ^b	115,86 ^b	37,70 ^{ab}
	<i>syncodChi42-1</i>	S1A-9	25,8 ^{cd}	34,1 ^{ab}	8,8 ^{bc}	113,58 ^{bc}	35,64 ^{cd}
		S1A-15	26,6 ^{bc}	33,8 ^{ab}	9,0 ^{bc}	115,52 ^b	36,94 ^b
	<i>Chi42</i>	WTA-2	25,2 ^{de}	31,8 ^b	8,0 ^d	113,42 ^{bc}	33,68 ^{ef}
WTA-4		25,2 ^{de}	34,1 ^{ab}	8,6 ^c	114,06 ^{bc}	35,82 ^{cd}	
Đối chứng không chuyển gen			24,4 ^f	31,2 ^b	7,6 ^d	107,26 ^d	31,76 ^h

Chú thích: KL - khối lượng

Số hoa/cây: Ra hoa là quá trình sinh lý tổng hợp của cây trồng đánh dấu một bước nhảy vọt về chất từ sinh trưởng dinh dưỡng sang sinh trưởng sinh sản. Tổng số hoa cũng như tỷ lệ hoa hữu hiệu có ảnh hưởng trực tiếp đến năng suất của cây lạc sau này. Tổng số hoa/cây của các dòng chuyển gen đều cao hơn đối chứng, dao động từ 24,6-28.

Trong đó, dòng S2A-12 có số hoa cao nhất còn đối chứng chỉ có 24,4 hoa. Awal và Ikeda (2003) cho rằng số lượng hoa trên cây là một trong những yếu tố quan trọng nhất quyết định năng suất của cây lạc [40]. Theo Lê Như Cương và cs (2019) số hoa phụ thuộc vào tốc độ sinh trưởng của cây, số hoa càng nhiều càng thể hiện cây sinh trưởng, phát triển tốt và cho năng suất cao [2]. Gongora và cs (2002) cũng báo cáo rằng số lượng hoa và quả trên cây cà chua chuyển gen ngày càng tăng, dẫn đến năng suất được nâng cao [104]. Điều này phù hợp với kết quả nghiên cứu của chúng tôi, tất cả các dòng lạc chuyển gen đều có số hoa/cây và năng suất cao hơn đối chứng không chuyển gen (Bảng 3.18).

Tỷ lệ hoa hữu hiệu: Tỷ lệ hoa hữu hiệu phản ánh số hoa tạo thành quả trong tổng số hoa được hình thành của cây. Tỷ lệ hoa hữu hiệu nhìn chung không có sự khác biệt giữa các dòng lạc, dao động từ 31,2-37,8%. Tỷ lệ hoa hữu hiệu cao nhất ở dòng S2A-12 (37,8%) và đây cũng là dòng lạc có năng suất cao nhất, thấp nhất vẫn là đối chứng (31,2%).

Số quả chắc/cây: Các dòng lạc chuyển gen đều có số quả chắc/cây cao hơn đối chứng từ 7,9-39,5%. Trong đó, các dòng *syncodChi42-2* mang promoter rễ cho số quả chắc trên cây cao nhất (9,4-10,6). Số quả chắc trên cây có liên quan chặt chẽ đến sự ra hoa tập trung và quá trình quang hợp của cây trồng để tích lũy chất khô. Thông thường, lạc ra hoa tập trung sớm sẽ cho tỷ lệ quả chắc trên cây cao.

Khối lượng 100 quả: Khối lượng 100 quả của các dòng lạc chuyển gen ít có sự sai khác thống kê nhưng đều cao hơn đối chứng từ 4,1-11,4%. Các dòng *syncodChi42-2* mang promoter Asy đặc hiệu rễ có khối lượng 100 quả dao động từ 115,86-119,5 g, cao hơn các dòng lạc chuyển gen còn lại. Trong đó, dòng S2A-12 có khối lượng 100 quả lớn hơn cả, đây cũng là dòng có các chỉ tiêu về chiều cao/cây, số lá/cây, tổng số cành/cây, hàm lượng Chl, số hoa/cây, tỷ lệ hoa hữu hiệu cao nhất.

Khối lượng 100 hạt: khối lượng 100 hạt của các dòng lạc chuyển gen được nghiên cứu dao động từ 33,06-38,74 g và đều cao hơn đối chứng (31,76 g). Trong đó, các dòng lạc chuyển gen *syncodChi42-2* dùng vector pNHL20 có khối lượng 100 hạt cao hơn các dòng chuyển gen còn lại, dao động từ 37,7-38,74 g và cao nhất vẫn là dòng S2A-12, cao hơn đối chứng không chuyển gen 22%.

Từ kết quả đánh giá các chỉ tiêu cấu thành năng suất của 16 dòng lạc chuyển gen nghiên cứu và đối chứng không chuyển gen. Nhận thấy các dòng lạc chuyển gen *syncodChi42-2* dưới sự điều khiển của promoter Asy đặc hiệu rễ có khối lượng 100 quả dao động từ 115,86-119,5 g tương đương với kết quả đạt được của giống lạc L14

trồng ở Thừa Thiên Huế trong nghiên cứu của Cuong và cs (2011, 2019) [2], [78]. Qua đó, có thể nhận thấy rằng các dòng lạc này có triển vọng cho việc khai thác hạt phục vụ sản xuất đồng thời tăng cường khả năng kháng nấm.

Một số nghiên cứu trước đây cũng đã mô tả hiệu quả của sự biểu hiện mức độ cao chitinase ở thực vật. Do đó, các gen chitinase có nhiều triển vọng được sử dụng để cải thiện cây trồng nhằm mục đích sản xuất bền vững các loại ngũ cốc, hoa quả, rau,... Chẳng hạn, Gongora và cs (2002) đã thông báo cây cà chua chuyển gen biểu hiện mức độ cao các gen endochitinase và chitobiosidase từ *Streptomyces albidoflavus* đã tăng đáng kể số lượng hoa và quả trên cây, dẫn đến tăng sản lượng của trái cây [104]. Huang và cs (2013) cũng chỉ ra rằng các dòng lúa mì được chuyển gen chitinase I (*RC24*) từ lúa đã nâng cao năng suất hạt lên 27-36% so với đối chứng không chuyển gen [121].

Theo các nghiên cứu được thực hiện bởi Nagpure và cs (2014), chitinase hỗ trợ sự phát triển của thực vật bằng cách cải thiện sức chịu đựng của cây đối với các stress sinh học và phi sinh học khác nhau làm giảm năng suất cây trồng [184]. Jeong và cs (2013), đã tạo ra dòng lúa chuyển gen bằng cách biểu hiện mức độ cao gen *OsNACS* dưới sự kiểm soát của promoter đặc hiệu rễ (*RCc3*) hoặc promoter thường trực (*GOS2*) thu được năng suất tăng lần lượt từ 9-23% và 9-26% trong điều kiện canh tác bình thường. Hơn nữa, nghiên cứu cũng cho thấy năng suất hạt cao hơn từ 22-63% ở *RCc3: OsNAC5* trong điều kiện khô hạn [132].

Gần đây, Liu và cs (2020) đã phát hiện ra rằng gen chitinase 2 (*LcCHI2*) ở thuốc lá và ngô chuyển gen không làm giảm khả năng sinh trưởng và năng suất trong điều kiện canh tác bình thường [156].

3.7.3. Đặc điểm hóa sinh

Lạc là loại hạt được tiêu thụ nhiều nhất trên toàn thế giới [203]. Hạt lạc rất giàu dinh dưỡng và chứa các thành phần có hoạt tính sinh học bao gồm protein, lipid, folate, niacin, magie, selen, arginine, α -tocopherol, mangan, acid béo không bão hòa và các chất polyphenol và phytosterol, có tác dụng bảo vệ chống lại bệnh tim mạch [125], [298]. Vì vậy, với người trồng lạc thì năng suất và chất lượng hạt lạc là được quan tâm hơn cả. Chính vì những lý do đó nên chúng tôi tiến hành xác định một số thành phần hóa sinh trong hạt lạc nhằm đánh giá chất lượng các dòng lạc chuyển gen nghiên cứu.

Từ đó, góp phần định hướng trong việc khai thác và phát triển các dòng lạc chuyển gen kháng nấm vào sản xuất trên quy mô lớn và có giá trị thương mại. Kết quả nghiên cứu được trình ở bảng 3.19.

3.7.3.1. Hàm lượng protein

Hạt lạc giàu protein hơn nhiều loại hạt khác. Chúng là một nguồn cung cấp protein dồi dào, đặc biệt cho những người ăn chay và thuần chay. Protein lạc đã được chứng minh là có hoạt tính nhũ hóa tốt, độ ổn định của nhũ tương, khả năng tạo bọt, giữ nước tuyệt vời và độ hòa tan cao, và cũng có thể cung cấp một loại thực phẩm mới có hàm lượng protein cao trong công nghiệp thực phẩm [287]. Kết quả nghiên cứu cho thấy, các dòng lạc chuyển gen có hàm lượng protein khá cao, dao động từ 23,11-26,14 g/100 g và cao hơn đối chứng (22,35 g/100 g). Theo USDA (2022), hàm lượng protein trung bình của hạt lạc đạt 24,0 g/100 g [278]. Các nghiên cứu khác cũng cho thấy hàm lượng protein trong hạt lạc đạt 25,8 g/100 g [36] và 22-30% protein/100 g hạt lạc [235]. Những phát hiện về hàm lượng protein trong cây lạc chuyển gen trong nghiên cứu này phù hợp với của Hassan và Ahmed (2012) [118] và Mora-Escobedo và cs (2015) [176].

3.7.3.2. Hàm lượng lipid

Hạt lạc rất giàu lipid, là loại hạt lấy dầu lớn nhất thế giới [229]. Từ năm 2020-2021, sản lượng dầu lạc đạt 6,14 triệu tấn [277]. Trong dầu lạc có hàm lượng acid oleic cao, đây được chứng minh là chất chống oxy hóa cao, có thể giúp giảm các rối loạn do stress gây ra. Hàm lượng lipid trong 100 g hạt lạc khô của các dòng lạc chuyển gen dao động từ 48,26-49,15 g. Mặc dù có sự sai khác có ý nghĩa thống kê về hàm lượng lipid giữa các dòng lạc chuyển gen chitinase và đối chứng, nhưng sự sai khác giữa chúng là nhỏ và nằm trong phạm vi được báo cáo ở các tài liệu về các giống lạc khác nhau [53], [89], [189]. Hàm lượng lipid của cây lạc thường chịu ảnh hưởng bởi kiểu gen, độ chín của hạt, điều kiện sinh trưởng, khu vực địa lý, mùa trồng trọt và tình trạng khí hậu [295].

3.7.3.3. Hàm lượng đường khử

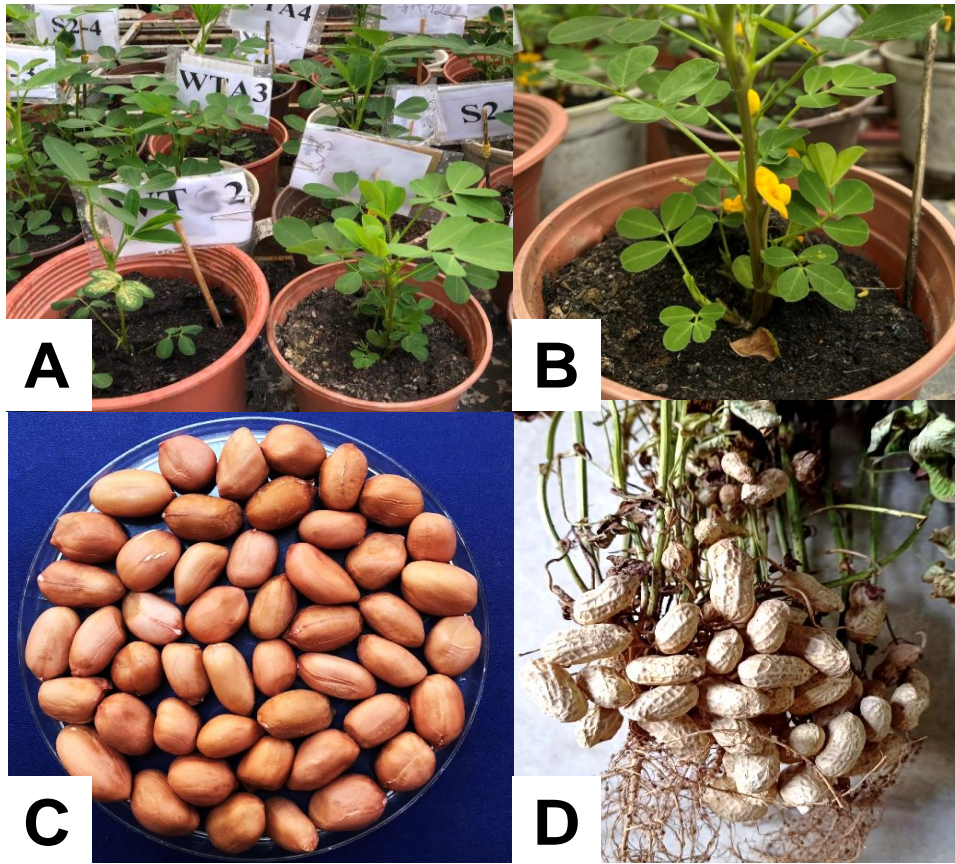
Hạt lạc có hàm lượng đường thấp hơn so với các loại hạt khác, trong 100 g hạt lạc khô có chứa khoảng 21,51 g carbohydrate, trong đó thành phần chính là tinh bột [278]. Trong các dòng lạc nghiên cứu thì hàm lượng đường khử dao động từ 0,92-

1,10 g/100 g. Trong đó, hàm lượng đường khử của hai dòng lạc chuyển gen là S2-6 và S2A-12 cao nhất với khoảng 1,10 g/100 g, tiếp đến là các dòng còn lại đạt 0,93-1,01 g/100 g, đối chứng 0,95 g/100 g.

Trong công nghiệp chế biến lạc, thành phần hóa sinh của hạt là một tiêu chí quan trọng để xác định quy trình công nghệ chế biến và chất lượng sản phẩm [267]. Hạt lạc chuyển gen chitinase cho thấy hàm lượng lipid và protein cao hơn so với đối chứng, đây là hai thông số quan trọng đối với các ngành công nghiệp chế biến lạc [36]. Số liệu này khẳng định thêm rằng cây lạc chuyển gen chitinase có thể thích hợp để sử dụng trong các chương trình nhân giống lạc kháng bệnh mà không làm giảm năng suất và chất lượng hạt.

Bảng 3.19. Thành phần hóa sinh trong hạt lạc khô của các dòng lạc chuyển gen chitinase

Vector	Gen	Các dòng lạc chuyển gen	Protein (g/100g)	Lipid (g/100g)	Đường khử (g/100g)
pNHL19	<i>syncodChi42-2</i>	S2-2	23,86 ^a	48,85 ^{ab}	0,96 ^a
		S2-4	23,45 ^a	48,57 ^{ab}	0,99 ^a
		S2-6	25,91 ^a	48,61 ^{ab}	1,10 ^a
	<i>syncodChi42-1</i>	S1-1	24,58 ^a	48,47 ^{ab}	1,04 ^a
		S1-2	25,76 ^a	48,47 ^{ab}	0,96 ^a
		S1-3	25,27 ^a	48,67 ^{ab}	0,93 ^a
	<i>Chi42</i>	WT-1	23,26 ^a	48,26 ^b	0,93 ^a
		WT-2	24,62 ^a	48,26 ^b	1,01 ^a
		WT-3	23,11 ^a	48,32 ^b	0,92 ^a
pNHL20	<i>syncodChi42-2</i>	S2A-12	26,33 ^a	49,15 ^a	1,10 ^a
		S2A-13	25,98 ^a	48,65 ^{ab}	1,04 ^a
		S2A-14	25,83 ^a	48,57 ^{ab}	1,01 ^a
	<i>syncodChi42-1</i>	S1A-9	24,96 ^a	48,43 ^{ab}	0,97 ^a
		S1A-15	25,75 ^{ab}	49,05 ^a	1,00 ^a
	<i>Chi42</i>	WTA-2	24,47 ^c	48,36 ^b	0,94 ^a
	WTA-4	23,33 ^a	48,39 ^b	0,97 ^a	
Đối chứng không chuyển gen			22,35 ^d	47,53 ^b	0,95 ^a



Hình 3.44. Cây lạc chuyển gen chitinase trồng trong nhà lưới. A và B: sinh trưởng của cây lạc chuyển gen, C và D: hạt và quả của cây lạc chuyển gen thu được ở thế hệ T_0 .

KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

1. KẾT LUẬN

1. Đã tối ưu được quy trình tái sinh *in vitro* giống lạc L14. Khử trùng hạt lạc bằng NaOCl 65% trong 10 phút, sau đó bóc vỏ và tách đôi hạt để nảy mầm. Tái sinh chồi từ các loại mẫu cây khác nhau của cây lạc và tạo cụm chồi trên môi trường MS có bổ sung 4 mg/L BAP và 0,1 mg/L NAA. Tạo rễ cho chồi *in vitro* trên môi trường MS có bổ sung NAA 0,5 mg/L NAA.

2. Đã tối ưu hóa trình tự nucleotide gen chitinase 42 kDa của *Trichoderma asperellum* SH16 cho biểu hiện thực vật. Hai trình tự gen có bộ ba tối ưu hóa biểu hiện cao ở thực vật đã được đăng ký trên GenBank với các mã số là MT083802.1 (*syncodChi41-1*) và MT083803.1 (*syncodChi41-2*). Đã thiết kế thành công các vector biểu hiện thực vật mang lần lượt 3 gen chitinase (*Chi42*, *syncodChi42-1* và *syncodChi42-2*) dưới sự điều khiển biểu hiện của một trong hai loại promoter: pAsy hoặc dp35S.

3. Đã biểu hiện và tinh sạch thành công chitinase có hoạt tính ở *E. coli*. Đồng thời đã sử dụng chitinase tinh sạch này để sản xuất thành công kháng thể đa dòng kháng Ta-CHI42 phục vụ phân tích Western blot.

4. Đã biểu hiện tạm thời thành công gen chitinase hoang dại (*Chi42*) của *T. asperellum* SH16 và 2 gen chitinase đã tối ưu hóa bộ ba thực vật (*syncodChi41-1* và *syncodChi41-2*) trong cây *N. benthamiana*. Enzyme từ 2 gen chitinase được tối ưu đã cho thấy hoạt tính thủy phân chitin cao hơn so với enzyme từ gen chitinase hoang dại.

5. Các yếu tố thích hợp cho chuyển gen chitinase vào giống lạc L14 qua trung gian *A. tumefaciens* LBA4404 đã được xác định. Mẫu vật được tiên nuôi cấy 3 ngày trước khi lây nhiễm vi khuẩn, lây nhiễm 20 phút ở OD₆₀₀ = 1,0 và đồng nuôi cấy mẫu vật với vi khuẩn trong tối 3 ngày trên môi trường có bổ sung acetosyringone 200 µM; mẫu chuyển gen được khử khuẩn với cefotaxime 250 mg/L và sàng lọc trên môi trường có chứa kanamycin 100 mg/L.

6. Đã biến nạp thành công 3 gen chitinase (*Chi42*, *syncodChi42-1*, và *syncodChi42-2*) trong vector biểu hiện thực vật pNHL19 và pNHL20 vào giống lạc L14 và tạo được 16 dòng lạc chuyển gen chitinase ở thế hệ T₀. Các dòng lạc chuyển gen được kiểm tra bằng PCR, Western blot, hoạt tính chitinase và khả năng kháng *S. rolfii* trong điều kiện *in vitro* và *in vivo*. Các gen đã được tối ưu *syncodChi42-1* và *syncodChi42-2* biểu hiện mạnh hơn gen hoang dại *Chi42*. Các dòng lạc chuyển gen

đều có xếp hạng bệnh thấp khi xử lý *S. rolfsii* trong điều kiện *in vivo*, thay đổi từ 1 đến 1,67, trong khi đối chứng là từ 4,33 đến 5,0.

7. Đã xác định giá thể thích hợp để trồng các dòng lạc chuyển gen từ *in vitro* ra đất là giá thể đất mùn phối trộn cát và đá vermiculite (1:1:1). Các dòng lạc chuyển gen có thời gian sinh trưởng từ 133-144 ngày trong điều kiện nhà lưới. Các chỉ tiêu sinh lý và hóa sinh của 16 dòng lạc chuyển gen tương tự hoặc cao hơn một ít so với đối chứng không chuyển gen.

2. KIẾN NGHỊ

1. Tiếp tục đánh giá khả năng kháng một số loài nấm gây hại lạc khác có thành tế bào bằng chitin của các dòng lạc chuyển gen chitinase.

2. Các dòng lạc chuyển gen chitinase có thể sử dụng làm vật liệu phục vụ chọn giống lạc, cho nên cần được tiếp tục phân tích ở các thế hệ tiếp theo để chọn tạo được dòng lạc có khả năng kháng nấm cao và ổn định.

CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. **Phung Thi Bich Hoa**, Nguyen Hoang Tue, Phan Thi Quyen Trang, Le Thi Hang, Nguyen Quang Duc Tien, Nguyen Hoang Loc (2021). An efficient protocol for *in vitro* regeneration of peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivar L14. *Bioscience Journal*, 37: e37019 (Q3).
2. Nguyen Ngoc Luong, Nguyen Quang Duc Tien, Nguyen Xuan Huy, Nguyen Hoang Tue, Le Quang Man, Duong Duc Hoang Sinh, Dang Van Thanh, Duong Thi Kim Chi, **Phung Thi Bich Hoa**, Nguyen Hoang Loc (2021). Expression of 42 kDa chitinase of *Trichoderma asperellum* (Ta-CHI42) from a synthetic gene in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 368 (16): fnab110 (Q2).
3. Nguyen Quang Duc Tien, **Phung Thi Bich Hoa**, Nguyen Hoang Tue, Dang Van Thanh, Hoang Anh Thi, Nguyen Ngoc Luong, Nguyen Xuan Huy, Nguyen Hoang Loc (2021). Transient expression of *Chi42* genes from *Trichoderma asperellum* in *Nicotiana benthamiana* by agroinfiltration. *International Journal of Agriculture & Biology*, 26: 177–184 (Q3).
4. **Phùng Thị Bích Hòa**, Mai Thị Thu Hiền, Nguyễn Hoàng Tuệ, Nguyễn Thị Kim Cơ, Nguyễn Tý, Nguyễn Xuân Huy (2021). Tạo dòng gen mã hóa chitinase 42 kDa của *Trichoderma asperellum* và dự đoán đặc tính của enzyme. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Khoa học Tự nhiên*, 30 (1C): 105–112.
5. Nguyen Ngoc Luong, Nguyen Quang Duc Tien, **Phung Thi Bich Hoa**, Nguyen Hoang Tue, Mai Thi Thu Hien, Nguyen Hoang Loc, Nguyen Xuan Huy (2021). Optimizing the production of a functional type a recombinant endochitinase from *Trichoderma asperellum* in *Escherichia coli*. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 9(6): 871–880 (Q4).
6. Nguyen Hoang Tue, Tran Gia Cat Tuong, Pham Thi Huyen Trang, Nguyen Duc Chung, **Phung Thi Bich Hoa**, Nguyen Quang Duc Tien, Nguyen Hoang Loc (2022). Cloning the root-specific *Asy* promoter and genes encoding chitinase 42 kDa of *Trichoderma asperellum* into the plant expression vector. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 10(3): 7–11 (Q3).

7. **Phung Thi Bich Hoa**, Nguyen Hoang Tue, Le Thi Thu Huyen, Luc Hoang Linh, Nguyen Thanh Nhan, Nguyen Quang Duc Tien, Nguyen Ngoc Luong, Nguyen Xuan Huy, Nguyen Hoang Loc (2022). Overexpression of 42 kDa chitinase genes from *Trichoderma asperellum* SH16 in peanut (*Arachis hypogaea*). *Journal of Crop Improvement*, <https://doi.org/10.1080/15427528.2022.2110346> (Q2).
8. **Phung Thi Bich Hoa**, Hoang Lan Phuong, Nguyen Thi Trang, Nguyen Thi Thanh Tuyen, Huynh Kim Vu, Truong Thi Hieu Thao, Nguyen Hoang Tue, Nguyen Xuan Huy (2022). Growth and development of transgenic peanut (*Arachis hypogaea*) lines containing chitinase 42 kDa gene from *Trichoderma asperellum* SH16. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*, 10(4): 789–796 (Q4).
9. **Phung Thi Bich Hoa**, Nguyen Hoang Tue, Hoang Lan Phuong, Nguyen Xuan Huy, Nguyen Hoang Loc (2022). Investigation on growth and development of 42 kDa chitinase transgenic peanuts (*Arachis hypogaea* L.) cultivar L14 under *in vivo* condition. *Research Journal of Biotechnology*. (Đã nhận đăng)
10. **Phùng Thị Bích Hòa**, Nguyễn Hoàng Tuệ, Phạm Thị Huyền Trang, Trần Gia Cát Tường, Huỳnh Thị Quỳnh Trang, Nguyễn Xuân Huy, Nguyễn Hoàng Lộc (2022). Tạo dòng các gen mã hóa chitinase 42 kDa của *Trichoderma asperellum* vào vector biểu hiện thực vật pMYV719 để phục vụ chuyển gen. *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Khoa học Tự nhiên*, 131(1C): 55–62.
11. Nguyễn Hoàng Tuệ, Lục Hoàng Linh, Lê Thị Hằng, Huỳnh Thị Quỳnh Trang, Nguyễn Xuân Huy, **Phùng Thị Bích Hòa** (2022). Khảo sát một số yếu tố ảnh hưởng đến quá trình biến nạp gen vào cây lạc (*Arachis hypogaea* L.) qua trung gian *Agrobacterium tumefaciens*. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế*. (Đã nhận đăng).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

TIẾNG VIỆT

1. Lê Như Cương, Nguyễn Thị Nhung và Nguyễn Thị Diễm (2018), Khả năng kháng nấm và hạn chế bệnh héo rũ gốc mốc trắng lạt (*Sclerotium rolfsii*) của dung dịch nano bạc, *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 127 (3A), tr. 167–171.
2. Lê Như Cương, Hoàng Kim Toàn, Nguyễn Xuân Vũ, Thái Thị Huyền, Lê Thị Thu Thảo (2019), Hiệu quả kích thích sinh trưởng và nâng cao năng suất của vi khuẩn *Bacillus* cho cây lạt ở Thừa Thiên Huế, *Tạp chí Khoa học Đại học Huế: Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 128 (3C): 13–22.
3. Đỗ Tấn Dũng (2006), Nghiên cứu bệnh héo rũ gốc mốc trắng (*Sclerotium rolfsii* SACC.) hại một số cây trồng cạn vùng Hà Nội và phụ cận năm 2005 – 2006, *Tạp chí Bảo vệ thực vật, Trường ĐH Nông nghiệp I Hà Nội*, Số 4.
4. Nguyễn Thị Mộng Điệp (2018), Thử khả năng đối kháng của nấm *Trichoderma* với nấm bệnh *Sclerotium rolfsii* hại lạt trong điều kiện *in vitro*, *Tạp chí Khoa học, Trường Đại học Quy Nhơn*, 12(5), Tr. 73 – 81.
5. Nguyễn Thị Minh Hằng, Hồ Thị Thương, Nguyễn Thu Giang, Phạm Bích Ngọc, Nguyễn Trung Nam, Chu Hoàng Hà (2018), Nghiên cứu tối ưu các điều kiện biểu hiện tạm thời gen mã hoá kháng nguyên M của virus PRRS trong lá cây thuốc lá *Nicotiana benthamiana*, *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 16(2): 293–300.
6. Lê Thị Thu Hiền (2014), *Nghiên cứu tái sinh in vitro và tạo cây ca cao (Theobroma cacao L.) chuyển gen. Mã số 10930 (2010–2014)*, Viện Nghiên cứu Hệ gen, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam. Thuộc Chương trình trọng điểm phát triển và ứng dụng Công nghệ sinh học trong lĩnh vực Nông nghiệp và Phát triển nông thôn đến năm 2020.
7. Đinh Minh Hiệp (2012), *Nghiên cứu chitinase và β -glucanase từ Trichoderma spp. và khả năng kiểm soát sinh học đối với một số nấm bệnh gây hại*, Luận án Tiến sĩ Nông nghiệp, Viện Sinh học Nhiệt đới.
8. Đinh Thái Hoàng, Vũ Đình Chính (2011), Đánh giá ảnh hưởng của mật độ trồng đến sinh trưởng và năng suất giống lạt TB25 trong Vụ Xuân tại Gia Lâm - Hà Nội, *Tạp chí Khoa học và Phát triển*, 9(6): 892–902.
9. Bùi Thị Lan Hương, Nguyễn Thị Trường, Vũ Duy Thanh, Nguyễn Thị Kim Lý,

- Nguyễn Đức Doanh, Phan Tô Phương, Nguyễn Hồng Minh, Lê Thị Ánh Hồng (2009), Nghiên cứu chuyển gen chitinase-glucanase kháng nấm vào cây cà chua thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 1(10): 2–7.
10. Phạm Thị Ngọc Lan, Hoàng Quốc Anh (2010), Tuyển chọn chủng vi khuẩn phân hủy chitin và khảo sát điều kiện sinh tổng hợp chitinase, *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, số 8, tr. 1639–1643.
 11. Trần Kim Loang, Lê Đình Đôn, Tạ Thanh Nam, Ngô Thị Xuân Thịnh (2009), Phòng trừ bệnh do nấm *Phytophthora* trên cây hồ tiêu bằng chế phẩm sinh học *Trichoderma* (Trico-VTN) tại Tây Nguyên, *Tạp chí chuyên ngành Bảo vệ thực vật*, số 2, tr. 22–27.
 12. Vũ Triệu Mân (2007), *Bệnh cây chuyên khoa*, Trường Đại học Nông nghiệp I, Hà Nội.
 13. Nguyễn Văn Nam, Nguyễn Anh Dũng, Nguyễn Thị Thanh và Ro Dong Park (2010), Chức năng Chitinase của nấm *Trichoderma Harzianum* T1 trong quá trình đối kháng với nấm gây bệnh *Fusarium solani*, *Tạp chí Công nghệ sinh học*, tr. 1633–1648.
 14. Nguyễn Thị Nguyệt, Nguyễn Thị Thanh, Trần Văn Minh Minh và Lê Như Cương (2004), Kết quả nghiên cứu nhóm bệnh héo rũ hại lạc và một số biện pháp phòng trừ tại Quảng Bình, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, 4, tr.1537–1538.
 15. Nguyễn Phương Huệ, Nguyễn Văn Hiếu và Phí Quyết Tiến (2010), Một số yếu tố ảnh hưởng đến khả năng sinh tổng hợp chitinase của chủng vi khuẩn *Bacillus circulans* HT11, *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, số 8, tr.1625–1632.
 16. Lê Lương Tề (1977), *Bệnh cây nông nghiệp*, Nxb Nông nghiệp, Hà Nội.
 17. Bùi Văn Thắng, Đinh Thị Phòng, Chu Hoàng Hà (2004), Nghiên cứu hệ thống tái sinh cây lạc (*Arachis hypogaea* L.) phục vụ cho chuyển gen, *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 2(3), tr. 371–379.
 18. Bùi Văn Thắng, Đỗ Xuân Đồng, Chu Hoàng Hà và Lê Trần Bình (2006), Nghiên cứu quy trình tái sinh cây lạc nhằm phục vụ chuyển gen (*Arachis hypogaea* L.), *Tạp chí Công nghệ Sinh học*, 2: 26–31.
 19. Nguyễn Văn Thắng, Nguyễn Thị Chinh, Nguyễn Xuân Hồng, Trần Đình Long, Hoàng Minh Tâm, Nguyễn Thái An (2020), *Giống lạc L14*, Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Đậu đỗ – Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm.
 20. Đồng Thị Thanh Thu (2008), *Sinh hóa ứng dụng*, Nxb Đại học Quốc Gia thành phố Hồ Chí Minh.
 21. Phạm Hồng Ngọc Thùy (2008), Bước đầu nghiên cứu thu nhận enzyme chitosanase

- kỹ thuật từ *Streptomyces griceus*, *Tạp chí Khoa học – Công nghệ Thủy sản*, 3, tr. 45–53.
22. 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), tr. 122–126.
23. Trần Văn Tý (2018), *Nghiên cứu hiệu quả sử dụng phân hữu cơ với chế phẩm Trichoderma và Pseudomonas cho cây lạc tại Thừa Thiên Huế*, Luận án Tiến sĩ Nông nghiệp, Trường Đại học Nông Lâm, Đại học Huế.

TIẾNG ANH

24. Abd-Allah E.F. (2005), Effect of a *Bacillus subtilis* isolate on southern blight (*Sclerotium rolfsii*) and lipid composition of peanut seeds, *Phytoparasitica*, 33(5), 460–466.
25. Abebe A., Tafa Z. (2022), A Review On: Impact of Genetic Engineering in Biotic Stresses Resistance Crop Breeding, *International Journal for Research in Applied Sciences and Biotechnology*, 9(2), 243–250.
26. Aboul-Maaty N.A.F., Oraby H.A.S. (2019), Extraction of high-quality Genomic DNA from Different Plant Orders Applying a Modified CTAB-based Method, *Bulletin of the National Research Centre*, 43: 25.
27. Abu-Tahon M.A., Isaac G.S. (2020), Anticancer and antifungal efficiencies of purified chitinase produced from *Trichoderma viride* under submerged fermentation, *The Journal of General and Applied Microbiology*, 66(1), 32–40.
28. Agarwal P., Gautam T., Singh A.K., Burma P.K. (2019), Evaluating the effect of codon optimization on expression of *bar* gene in transgenic tobacco plants, *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 28:189–202.
29. Akasaka Y., Daimon H., Mii M. (2000), Improved plant regeneration from cultured leaf segments in peanut (*Arachis hypogaea* L.) by limited exposure to thidiazuron. *Plant Science*, 156(2), 169–175.
30. Akram Z., Ali S., Ali G.M., Zafar Y., Shah Z.H., Alghabari F. (2016), Whisker-mediated transformation of peanut with chitinase gene enhances resistance to leaf spot disease, *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 16(2), 108–114.
31. Ali A., Javaid A., Shoaib A., Khan I.H. (2020), Effect of soil amendment with *Chenopodium album* dry biomass and two *Trichoderma* species on growth of

- chickpea var. Noor 2009 in *Sclerotium rolfsii* contaminated soil. *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 30: 102.
32. Alias N., Mahadi N.M., Murad A.M.A., Bakar F.D.A., Mahmood N.A.N., Illias R.M. (2009), Expression and characterization of *Trichoderma virens* UKM-1 endochitinase in *Escherichia coli*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 25(4), 561–572.
 33. Anandalakshmi R., Pruss G.J., Ge X., Marathe R., Mallory A.C., Smith T. H., Vance V. B. (1998), A viral suppressor of gene silencing in plants, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(22), 13079–13084.
 34. Anuradha T.S., Jami S.K., Datla R.S., Kirti P.B. (2006), Genetic transformation of peanut (*Arachis hypogaea* L.) using cotyledonary node as explant and a promoterless gus: npt II fusion gene based vector, *Journal of Biosciences*, 31(2), 235–246.
 35. Arnon D.I. (1949), Copper enzymes in isolated chloroplasts, polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24(1): 1–15.
 36. Arya S.S., Salve A.R., Chauhan S. (2016), Peanuts as functional food: a review. *Journal of food science and technology*, 53(1), 31–41.
 37. Asad S. A., Tabassum A., Hameed A., Afzal A., Khan S. A., Ahmed R., Shahzad M. (2015), Determination of lytic enzyme activities of indigenous *Trichoderma* isolates from Pakistan, *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(4), 1053–1064.
 38. Ashutosh V., Ritu M., Asha M., Pushpa R. (2012), Transformation of groundnut-*Arachis hypogaea* L. var. GG20 with the cox gene-an attempt to develop salinity tolerance, *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 3(1B), 591–599.
 39. Athmaram T. N., Bali G., Devaiah K. M. (2006), Integration and expression of Bluetongue VP2 gene in somatic embryos of peanut through particle bombardment method. *Vaccine*, 24(15), 2994–3000.
 40. Awal M. A., Ikeda T. (2003), Controlling canopy formation, flowering, and yield in field-grown stands of peanut (*Arachis hypogaea* L.) with ambient and regulated soil temperature, *Field Crops Research*, 81(2-3), 121–132.
 41. Aycock R. (1966), *Stem rot and other diseases caused by Sclerotium rolfsii or the status of Rolfs' fungus after 70 years*, Raleigh: North Carolina State Univ.
 42. Baek J. M., Howell C. R., Kenerley C. M. (1999), The role of an extracellular chitinase from *Trichoderma virens* Gv29-8 in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*, *Current genetics*, 35(1), 41–50.
 43. Baiyee B., Ito S. I., Sunpapao A. (2019a), *Trichoderma asperellum* T1 mediated

- antifungal activity and induced defense response against leaf spot fungi in lettuce (*Lactuca sativa* L.). *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 106, 96–101.
44. Baiyee B., Pornsuriya C., Ito S. I., Sunpapao A. (2019b), *Trichoderma spirale* T76-1 displays biocontrol activity against leaf spot on lettuce (*Lactuca sativa* L.) caused by *Corynespora cassiicola* or *Curvularia aeria*, *Biological Control*, 129, 195–200.
 45. Bansode V.B., Bajekal S.S. (2006), Characterization of chitinases from microorganisms isolated from Lonar lake, *Indian Journal of Biotechnology*, 5:357–63.
 46. Baranski R., Klocke E., Nothnagel T. (2008), Chitinase CHIT36 from *Trichoderma harzianum* enhances resistance of transgenic carrot to fungal pathogens, *Journal of Phytopathology*, 156(9):513–521.
 47. Beena M.R., Tuli R., Gupta A.D., Kirti P.B. (2008), Transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L.) plants expressing cryIEC and rice chitinase cDNA (*Chi11*) exhibit resistance against insect pest *Spodoptera litura* and fungal pathogen *Phaeoisariopsis personata*, *Transgenic Plant Journal*, 2:157–164.
 48. Betts S.D., Basu S., Bolar J., Booth R., Chang S., Cigan A.M., Farrell J., Gao H., Harkins K., Kinney A., Lenderts B., Li Z., Liu L., McEnany M., Mutti J., Peterson D., Sander J.D., Scelonge C., Sopko X., Stucker D., Wu E., Chilcoat N.D. (2019), Uniform expression and relatively small position effects characterize sister transformants in maize and soybean, *Frontiers in Plant Science*, 10: 1209.
 49. Bhatnagar M., Prasad K., Bhatnagar-Mathur P., Narasu M.L., Waliyar F., Sharma K.K. (2010), An efficient method for the production of marker-free transgenic plants of peanut (*Arachis hypogaea* L.), *Plant Cell Reports*, 29(5): 495–502.
 50. Bhattacharya D., Nagpure A., Gupta R.K. (2007), Bacterial chitinases: properties and potential, *Critical Reviews in Biotechnology*, 27(1):21–28.
 51. Bilyk B., Horbal L., Luzhetskyy A. (2017), Chromosomal position effect influences the heterologous expression of genes and biosynthetic gene clusters in *Streptomyces albus* J1074, *Microbial Cell Factories*, 16: 5.
 52. Boer H., Simolin H., Cottaz S., Söderlund H., Koivula A. (2007), Heterologous expression and site-directed mutagenesis studies of two *Trichoderma harzianum* chitinases, *Chit33* and *Chit42*, in *Escherichia coli*, *Protein expression and purification*, 51(2):216–226.

53. Bogino P., Bancho E., Rinaudi L., Cerioni G., Bonfiglio C., Giordano W. (2006), Peanut (*Arachis hypogaea* L.) response to inoculation with *Bradyrhizobium* sp. in soils of Argentina, *Annals of Applied Biology*, 148: 207–212.
54. Bosamia T.C., Dodia S.M., Mishra G.P., Ahmad S., Joshi B., Thirumalaisamy P.P., Kumar N., Rathnakumar A.L., Sangh C., Kumar A., Thankappan R. (2020), Unraveling the mechanisms of resistance to *Sclerotium rolfsii* in peanut (*Arachis hypogaea* L.) using comparative RNA-Seq analysis of resistant and susceptible genotypes, *Plos one*, 15(8): e0236823.
55. Bradford M.M. (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Analytical Biochemistry*, 72:248–254.
56. Branch W.D. (2004), Registration of 'Georgia-03L' peanut, *Crop Science*, 44:1485–1486.
57. Branch W.D., Brenneman T.B. (2009), Field evaluation for the combination of white mould and tomato spotted wilt disease resistance among peanut genotypes, *Crop Protection*, 28(7), 595–598.
58. Brockwell J., Bottomley P.J., Thies J.E. (1995), Manipulation of rhizobia microflora for improving legume productivity and soil fertility: a critical assessment, *Plant and soil*, 174(1), 143–180.
59. Brotman Y., Landau U., Pnini S., Lisek J., Balazadeh S., Mueller-Roeber B., Zilberstein A., Willmitzer L., Chet I., Viterbo A. (2012), The LysM receptor-like kinase LysM RLK1 is required to activate defense and abiotic-stress responses induced by overexpression of fungal chitinases in *Arabidopsis* plants, *Molecular Plant*, 5(5): 1113–1124.
60. Calissendorff J., Falhammar H. (2017), Lugol's solution and other iodide preparations: Perspectives and research directions in Graves' disease, *Endocrine* 58:467–473.
61. Castro S.P.M., Paulín E.G.L. (2012), *The Complex World of Polysaccharides*. Rijeka: InTech, Chapter 1, Is Chitosan a New Panacea? Areas of Application, 1–46.
62. Centre for Research in Agricultural Genomics (2017), *Key mechanism in the plant defense against fungal infections*.
63. Chan Z., Bigelow P.J., Loescher W., Grumet R. (2012), Comparison of salt stress resistance genes in transgenic *Arabidopsis thaliana* indicates that extent of transcriptomic change may not predict secondary phenotypic or fitness effects, *Plant*

- Biotechnology Journal*, 10(3): 284–300.
64. Cheba B.A., Zaghloul T.I., EL-Massry M.H., EL-Mahdy A.R. (2016), Effect of metal ions, chemical agents, and organic solvent on *Bacillus sp.* R2 chitinase activity, *Procedia Technology*, 22, 465–470.
 65. Chen K.R., Ren L., Xu L., Chen W., Liu F., Fang X.P. (2018), Research progress on peanut southern stem rot caused by *Sclerotium rolfsii*, *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 40(2): 302–308.
 66. Chen L., Jiang B., Wu C., Sun S., Hou W., Han T. (2014), GmPRP2 promoter drives root-preferential expression in transgenic *Arabidopsis* and soybean hairy roots, *BMC plant biology*, 14(1): 1–13.
 67. Chen M., Yang Q., Wang T., Chen N., Pan L., Chi X., Yang Z., Wang M., Yu S. (2015), *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of peanut and the efficient recovery of transgenic plants, *Canadian Journal of Plant Science*, 95 (4): 735–744.
 68. Chen Q., Lai H., Hurtado J., Stahnke J., Leuzinger K., Dent M. (2013), Agroinfiltration as an effective and scalable strategy of gene delivery for production of pharmaceutical proteins, *Advanced Techniques in Biology & Medicine*, 1(1): 103.
 69. Chen X., Equi R., Baxter H., Berk K., Han J., Agarwal S., Zale J. (2010), A high-throughput transient gene expression system for switchgrass (*Panicum virgatum* L.) seedlings, *Biotechnology for Biofuels*, 3(1): 1–10.
 70. Chenault K.D., Burns J.A., Melouk H.A., Payton M.E. (2002), Hydrolase activity in transgenic peanut, *Peanut Science*, 29(2), 89–95.
 71. Cheng M., Lowe B.A., Spencer T.M., Ye X., Armstrong C.L. (2004), Factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation of monocotyledonous species, *In Vitro Cellular and Developmental Biology – Plant*, 40: 31–45.
 72. Chin J.X., Chung B.K.S., Lee D.Y. (2014), Codon optimization online (COOL): a web-based multi-objective optimization platform for synthetic gene design, *Bioinformatics*, 30(15):2210–2212.
 73. Cid L.B., Machado A.C.M.G., Carvalheira S.B.R.C., Brasileiro A.C.M. (1999), Plant regeneration from seedling explants of *Eucalyptus grandis* x *E urophyllia*, *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 56(1): 17–24.
 74. Cilliers A.J., Pretorius Z.A., Van Wyk P.S. (2003), Integrated control of *Sclerotium rolfsii* on groundnut in South Africa, *Journal of Phytopathology*, 151(5): 249–258.
 75. Collinge D.B., Kragh K.M., Mikkelsen J.D., Rasmussen U., Vad K. (1993), Plant chitinases (Mini review), *Plant Journal*, 3: 31–40.

76. Cooper H.M., Paterson Y. (2009), *Production of polyclonal antisera*. In: Current Protocols in Neuroscience. Chapter 5: Unit 5.5.
77. Cuong N.L., Kruijt M., Raaijmakers J.M. (2012), Involvement of phenazines and lipopeptides in interactions between *Pseudomonas* species and *Sclerotium rolfsii*, causal agent of stem rot disease on groundnut, *Journal of Applied Microbiology*, 112: 390–403.
78. Cuong N.L. (2011), *Diversity and biological control of Sclerotium rolfsii, causal agent of stem rot of groundnut*. PhD Thesis, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.
79. da Silva L.R., de Barros Rodrigues L.L., Zacaroni A.B., de Castro B.S., Sifuentes D.N., Botelho A.S., Moraes M.C.B., de Mello S. C. M. (2022), *Sclerotium rolfsii* mycelial profile analysis by MALDI-TOF related to biological control, volatile organic compounds diversity and onion growth promotion, as influenced by *Trichoderma* spp, *Biological Control*, 172: 104970.
80. D'aes J., De Maeyer K., Pauwelyn E., Höfte M. (2010), Biosurfactants in plant - *Pseudomonas* interactions and their importance to biocontrol, *Environmental Microbiology Reports*, 2(3): 359–372.
81. Dahiya N., Tewari R., Hoondal G. S. (2006), Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes: a review, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(6): 773–782.
82. Daniell H., Ruiz G., Denes B., Sandberg L., Langridge W. (2009), Optimization of codon composition and regulatory elements for expression of human insulin like growth factor-1 in transgenic chloroplasts and evaluation of structural identity and function, *BMC Biotechnology*, 9(1): 1–16.
83. Danielson D.C., Pezacki J.P. (2013), Studying the RNA silencing pathway with the p19 protein, *FEBS Letters*, 587(8): 1198–1205.
84. De Klerk G.J., Brugge J.T., Marinova S. (1997). Effectiveness of indoleacetic acid, indolebutyric acid and naphthaleneacetic acid during adventitious root formation in vitro in Malus 'Jork 9', *Plant cell, tissue and organ culture*, 49(1): 39–44.
85. De Paoli L.G., Camargo R.L.B., Harakava R., Mendes B.M.J., Filho F.D.A.A. (2007), Genetic transformation of "Valencia" orange with the cecropin MB39 gene, *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 42:1663–1666.
86. Deng J.J., Shi D., Mao H.H., Li Z.W., Liang S., Ke Y., Luo X.C. (2019), Heterologous expression and characterization of an antifungal chitinase (*Chit46*) from

- Trichoderma harzianum* GIM 3.442 and its application in colloidal chitin conversion, *International Journal of Biological Macromolecules*, 134:113–121.
87. Ding B. J., Hofvander P., Wang H. L., Durrett T. P., Stymne S., Löfstedt C. (2014). A plant factory for moth pheromone production. *Nature communications*, 5(1): 3353.
 88. Dodia S.M., Joshi B., Gangurde S.S., Thirumalaisamy P.P., Mishra G.P., Narandrakumar D., Soni P., Rathnakumar A.L., Dobarra J.R., Sangh C., Chitikineni A., Chanda S.V., Pandey M.K., Varshney R.K., Thankappan R. (2019), Genotyping-by-sequencing based genetic mapping reveals large number of epistatic interactions for stem rot resistance in groundnut, *Theoretical and Applied Genetics*, 132(4): 1001–1016.
 89. Dolatabadi B., Ranjbar G., Tohidfar M., Dehestani A. (2014), Genetic transformation of tomato with three pathogenesis-related protein genes for increased resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*, *Journal of Plant Molecular Breeding*, 2(1): 1–11.
 90. Duo-Chuan, L. (2006). Review of fungal chitinases. *Mycopathologia*, 161(6), 345–360.
 91. Ekundayo E.A., Ekundayo F.O., Bamidele F. (2016), Production, partial purification and optimization of a chitinase produced from *Trichoderma viride*, an isolate of maize cob, *Mycosphere*, 7: 786–793.
 92. El-Katatny M.H., Somitsch W., Robra K.H., El-Katatny M.S., Gübitz G.M. (2000), Production of chitinase and β -1, 3-glucanase by *Trichoderma harzianum* for control of the phytopathogenic fungus *Sclerotium rolfsii*, *Food Technology and Biotechnology*, 38(3): 173–180.
 93. El-Katatny M., Gudelj M., Robra K.H., Elnaghy M., Gübitz, G. (2001), Characterization of a chitinase and an endo- β -1, 3-glucanase from *Trichoderma harzianum* Rifai T24 involved in control of the phytopathogen *Sclerotium rolfsii*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(1): 137–143.
 94. Emani C., Garcia J.M., Lopata-Finch E., Pozo M.J., Uribe P., Kim D.J., Sunilkumar G., Cook D.R., Kenerley C.M., Rathore K.S. (2003), Enhanced fungal resistance in transgenic cotton expressing an endochitinase gene from *Trichoderma virens*, *Plant Biotechnology Journal*, 1: 321–336.
 95. Farr D.F., Bills G.F., Chamuris G.P., Rossman A.Y. (1989), Fungi on plants and plant products in the United States, *American Phytopathology Society*, 1252.

96. Feng Y.Q., Lorincz M.C., Fiering S., Grealley J.M., Bouhassira E.E. (2001), Position effects are influenced by the orientation of a transgene with respect to flanking chromatin, *Molecular and Cellular Biology*, 21: 298–309.
97. Fischer R., Vaquero-Martin C., Sack M., Drossard J., Emans N., Commandeur U. (1999), Towards molecular farming in the future: transient protein expression in plants, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 30(2): 113–116.
98. Fletcher D.J. (1984), Plasma glucose and plasma fatty acid levels of *Limanda limanda* (L.) in relation to season, stress, glucose loads and nutritional state, *Journal of Fish Biology*, 25(6): 629–648.
99. Fortin C., Nester E.W., Dion P. (1992), Growth inhibition and loss of virulence in cultures of *Agrobacterium tumefaciens* treated with acetosyringone, *Journal of Bacteriology*, 174(17): 5676–5685.
100. Gavel Y., Heijne G.V. (1990), Sequence differences between glycosylated and non-glycosylated Asn-X-Thr/Ser acceptor sites: implications for protein engineering, *Protein engineering*, 3(5): 433–442.
101. Geng L., Duan X., Liang C., Shu C., Song F., Zhang J. (2014), Mining tissuespecific contigs from peanut (*Arachis hypogaea* L.) for promoter cloning by deep transcriptome sequencing, *Plant and Cell Physiology*, 55: 1793–801.
102. Geng L., Niu L., Shu C., Song F., Huang D., Zhang J. (2011), High-efficiency regeneration of peanut (*Arachis hypogaea* L.) plants from leaf discs, *African Journal of Biotechnology*, 10(59): 12650–12652.
103. Ghewande M.P., Desai S., Basu M.S. (2002), Diagnosis and management of major diseases of groundnut, *NRCG Bull*, 1: 8–9.
104. Ghorbel-Bellaaj O., Manni L., Jellouli K., Hmidet N., Nasri M. (2012), Optimization of protease and chitinase production by *Bacillus cereus* SV1 on shrimp shell waste using statistical experimental design. Biochemical and molecular characterization of the chitinase, *Annals of Microbiology*, 62(3): 1255–1268.
105. Gongora C.E., Broadway R.M. (2002), Plant growth and development influenced by transgenic insertion of bacterial chitinolytic enzymes, *Molecular Breeding*, 9(2): 123–135.
106. Gorbet D.W., Tillman B.L. (2009), Registration of ‘Florida-07’ peanut, *Journal of Plant Registrations*, 3(1): 14–18.
107. Grassby T., Mandalari G., Grundy M.M.L., Edwards C.H., Bisignano C., Trombetta D., Waldron K.W. (2017), *In vitro* and *in vivo* modeling of lipid bioaccessibility and

- digestion from almond muffins: The importance of the cell-wall barrier mechanism, *Journal of Functional Foods*, 37: 263–271.
108. Grimsley N., Hohn B., Hohn T., Walden R. (1986), “Agroinfection,” an alternative route for viral infection of plants by using the Ti plasmid, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(10): 3282–3286.
109. Grodzinxki A.M., Grodzinxki D.M. (1981), *Handbook of Plant Physiology*, Technology and Science Publishing House, Ha Noi, Vietnam (in Vietnamese).
110. Grover A. (2012), Plant chitinases: Genetic diversity and physiological roles, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 31: 57–73.
111. Grunennvaldt R.L., Degenhardt-Goldbach J. (2015), Promoters used in genetic transformation of plants, *Research Journal of Biological Sciences*, 10: 1–9.
112. Guerra Y.D.L, de Oliveira T.A.S., Laranjeira D., Lima L.M., Filho P.D.A.M., dos Santos R.C. (2015), Control of *Sclerotium rolfsii* in peanut by using *Cymbopogon martinii* essential oil, *African Journal of Microbiology Research*, 9(27): 1684–1691.
113. Gutiérrez R.A., MacIntosh G.C., Green P.J. (1999), Current perspectives on mRNA stability in plants: multiple levels and mechanisms of control, *Trends in Plant Science*, 4(11): 429–438.
114. Gutiérrez-Ortega A., Sandoval-Montes C., de Olivera-Flores T.J., Santos-Argumedo L., Gómez-Lim M.Á. (2005), Expression of functional interleukin-12 from mouse in transgenic tomato plants, *Transgenic Research*, 14(6): 877–885.
115. Hamid R., Khan M.A., Ahmad M., Ahmad M.M., Abdin M.Z, Musarrat J., Javed S. (2013), Chitinases: An update, *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 5(1): 21–29.
116. Harjono, Widyastuti S.M. (2001), Antifungal activity of purified endochitinase produced by biocontrol agent *Trichoderma reesei* against *Ganoderma philippii*, *Pakistan Journal Biology Sciences*, 4: 1232–1234.
117. Harman G.E., Howell C.R., Viterbo A., Chet I., Lorito M. (2004), *Trichoderma* species-opportunistic, avirulent plant symbionts, *Nature reviews microbiology*, 2(1): 43–56.
118. Hassan F., Ahmed M. (2012), Oil and fatty acid composition of peanut cultivars grown in Pakistan, *Pakistan Journal of Botany*, 44(2): 627–630.
119. Henrissat B. (1991), A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities, *Biochemical Journal*, 280(2), 309–316.
120. Hong J.K., Hwang B.K. (2006), Promoter activation of pepper class II basic

- chitinase gene, *CAChi2*, and enhanced bacterial disease resistance and osmotic stress tolerance in the *CAChi2*-overexpressing *Arabidopsis*, *Planta*, 223(3): 433–448.
121. Huang X., Wang J., Du Z., Zhang C., Li L., Xu Z. (2013), Enhanced resistance to stripe rust disease in transgenic wheat expressing the rice chitinase gene *RC24*, *Transgenic Research*, 22(5): 939–947.
122. Huy N.X., Tien N.Q.D., Kim M.Y., Kim T.G., Jang Y.S., Yang M.S. (2016), Immunogenicity of an S1D epitope from porcine epidemic diarrhea virus and cholera toxin B subunit fusion protein transiently expressed in infiltrated *Nicotiana benthamiana* leaves, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 127(2): 369–380.
123. Ibrahim A.K., Khalifa S., Khafagi I., Youssef D., Khan I.M. (2007), Stimulation of oleandrin production by combined *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and fungal elicitation in *Nerium oleander* cell cultures, *Enzyme and Microbial Technology*, 41: 331–336.
124. Iqbal M.M., Nazir F., Ali S., Asif M.A., Zafar Y., Iqbal J., Ali G.M. (2012), Over expression of rice chitinase gene in transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L.) improves resistance against leaf spot, *Molecular Biotechnology*, 50: 129–136.
125. Ishida N., Okubo A., Kawai H., Yamazaki S., Toda S. (1980), Interaction of amino acids with transition metal ions in solution (I) solution structure of Llysine with Co(II) and Cu(II) ions as studied by nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Agricultural and Biological Chemistry*, 44(2): 263–270.
126. Ivanov V.Y., Hutryra L.R., Wofsy S.C., Munger J.W., Saleska S.R., de Oliveira R.C., De Camargo P.B. (2012), Root niche separation can explain avoidance of seasonal drought stress and vulnerability of overstory trees to extended drought in a mature Amazonian forest, *Water Resources Research*, 48(12).
127. Jafari Azad B., Daneshzad E., Azadbakht L. (2020), Peanut and cardiovascular disease risk factors: A systematic review and meta-analysis, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 60(7): 1123–1140.
128. Jagadeesh B., Kumar M.H., Shekhar M.R., Sudhakar P. (2011), Amenability of the sugarcane variety 2005 T 16 to shoot tip culture, *Journal of Sugarcane Research*, 1(2): 75–77.
129. Jankiewicz U., Baranowski B., Brzezinska S., Frąk, M. (2020), Purification, characterization and cloning of a chitinase from *Stenotrophomonas rhizophila* G22, *3 Biotech*, 10(1): 1–10.

130. Javaid A., Ali A., Shoaib A., Khan I.H. (2021), Alleviating stress of *Sclerotium rolfsii* on growth of chickpea var. Bhakkar-2011 by *Trichoderma harzianum* and *T. viride*, *Journal of Animal & Plant Sciences*, 31(6): 1755–1761.
131. Jefferson R.A., Klass M., Wolf N., Hirsh D. (1987), Expression of chimeric genes in *Caenorhabditis elegans*. *Journal of Molecular Biology*, 193(1): 41–46.
132. Jeong J.S., Kim Y.S., Baek K.H., Jung H., Ha S.H., Do Choi Y., Kim M., Reuzeau C., Kim J.K. (2010), Root-specific expression of OsNAC10 improves drought tolerance and grain yield in rice under field drought conditions, *Plant Physiology*, 153(1): 185–197.
133. Jha B., Mishra A., Chaturvedi A.K. (2016), *Engineering stress tolerance in peanut (Arachis hypogaea L.)*, In Watson R and Preedy VR (eds.) *Genetically modified organisms (GMO) foods: production, regulation and public health*. San Diego, CA, USA: Academic Press, Elsevier, 305–311.
134. Jinzhu S., Qian Y., Beidong L., Dianfu C. (2005), Expression of the chitinase gene from *Trichoderma aureoviride* in *Saccharomyces cerevisiae*, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 69(1): 39–43.
135. Jogi A., Kerry J.W., Brenneman T.B., Leebens-Mack J.H., Gold S.E. (2016), Identification of genes differentially expressed during early interactions between the stem rot fungus (*Sclerotium rolfsii*) and peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars with increasing disease resistance levels, *Microbiological Research*, 184: 1–12.
136. Jung J.W., Kim N.S., Jang S.H., Shin Y.J., Yang M.S. (2016), Production and characterization of recombinant human acid -glucosidase in transgenic rice cell suspension culture, *Journal of Biotechnology*, 226: 44–53.
137. Karthik N., Binod P., Pandey A. (2017), Chitinases. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, 335–368, Elsevier.
138. Karthikeyan V., Sankaralingam A., Nakkeeran S. (2006), Biological control of groundnut stem rot caused by *Sclerotium rolfsii* (Sacc.), *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 39(3): 239–246.
139. Kemerait R. (2006), *Peanut*. In *2005 Georgia Plant Disease Loss Estimates* ed. Martinez, A. p.11. Georgia: University of Georgia, Cooperative Extension Service.
140. Khan A., Nasir I.A., Tabassum B., Aaliya K., Tariq M., Rao A.Q. (2017), Expression studies of chitinase gene in transgenic potato against *Alternaria solani*, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture, (PCTOC)*, 128(3): 563–576.
141. Khan I.H., Javaid A., Al-Taie A.H., Ahmed D. (2020), Use of neem leaves as soil

- amendment for the control of collar rot disease of chickpea, *Egyptian Journal of Biological Pest Control*, 30(1): 1–8.
142. Khan R.S., Kameya N., Mii M., Nakamura I. (2012), Transgenic *Petunia hybrida* expressing a synthetic fungal chitinase gene confers disease tolerance to *Botrytis cinerea*, *Plant Biotechnology*, 29: 285–291.
143. Kokalis-Burelle N., Porter D.M., Rodriguez-Kabana R., Smith D.H., Subrahmanyam, P. (1997), *Compendium of peanut diseases* (Vol. 2), American Phytopathological Society.
144. Kong K., Makabe S., Ntui V.O., Khan R.S., Nakamura I. (2014), Synthetic chitinase gene driven by root-specific *LjNRT2* and *AtNRT2.1* promoters confers resistance to *Fusarium oxysporum* in transgenic tobacco and tomato, *Plant Biotechnology Reports*, 8: 151–159.
145. Kopertekh L., Schiemann J. (2005), Agroinfiltration as a tool for transient expression of *cre* recombinase *in vivo*, *Transgenic Research*, 14: 793–798.
146. Kumar M., Brar A., Yadav M., Chawade A., Vivekanand V., Pareek N. (2018), Chitinases - potential candidates for enhanced plant resistance towards fungal pathogens, *Agriculture*, 8(7): 88.
147. Kumar K., Amaresan N., Bhagat S., Madhuri K., Srivastava R.C. (2012), Isolation and characterization of *Trichoderma* spp. for antagonistic activity against root rot and foliar pathogens, *Indian Journal of Microbiology*, 52(2): 137–144.
148. Lamboro A., Han X., Yang S., Li X., Yao D., Moussa A.A., Chaudhry M.R., Ilboudo H., Song B., Wu Q., Xing Y., Zhang J. (2022), High-frequency direct organogenesis from cotyledonary node explants and plantlet regeneration of peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars, *International Journal Of Agriculture & Biology*, 27(2): 105–114.
149. Landim P.G.C., Correia T.O., Silva F.D.A., Nepomuceno D.R., Costa H.P.S., Pereira H.M., Lobo M.D.P., Moreno F.B.M.B., Brandão-Neto J., Medeiros S.C., Vasconcelos I.M., Oliveira J.T.A., Sousa B.L., Barroso-Neto I.L., Freire V.N., Carvalho C.P.S., Monteiro-Moreira A.C.O., Grangeiroa T.B. (2017), Production in *Pichia pastoris*, antifungal activity and crystal structure of a class I chitinase from cowpea (*Vigna unguiculata*): insights into sugar binding mode and hydrolytic action. *Biochimie*, 135: 89–103.
150. Langner T., Göhre V. (2016), Fungal chitinases: function, regulation, and potential roles in plant/pathogen interactions, *Current genetics*, 62(2): 243–254.

151. Lee H.J., Lee Y.S., Choi Y.L. (2018), Cloning, purification, and characterization of an organic solvent-tolerant chitinase, MtCh509, from *Microbulbifer thermotolerans* DAU221, *Biotechnol Biofuels*, 11(1): 1-14.
152. Leuzinger K., Dent M., Hurtado J., Stahnke J., Lai H., Zhou X., Chen Q. (2013), Efficient agroinfiltration of plants for high-level transient expression of recombinant proteins, *Journal of Visualized Experiments (JoVE)*, (77): e50521.
153. Li S., Zhang B., Zhu H., Zhu T. (2018), Cloning and expression of the chitinase encoded by *ChiKJ406136* from *Streptomyces sampsonii* (Millard & Burr) Waksman KJ40 and its antifungal effect, *Forests*, 9(11): 699.
154. Limbua P.G., Ngugi M.P., Oduor R.O. (2019), *In vitro* regeneration protocol of Kenyan adapted groundnut (*Arachis hypogaea* L.) genotypes using cotyledonary node explants, *Journal Plant Biochemistry & Physiology*, 7(1): 1000233.
155. Liu P.F., Wang Y., Ulrich R.G., Simmons C.W., VanderGheynst J.S., Gallo R.L., Huang C.M. (2018), Leaf-encapsulated vaccines: Agroinfiltration and transient expression of the antigen staphylococcal endotoxin B in radish leaves, *Journal of Immunology Research*, Article 3710961.
156. Liu X., Yu Y., Liu Q., Deng S., Jin X., Yin Y., Guo J., Li N., Liu Y., Han S., Wang C. Hao D. (2020), A Na₂CO₃-responsive chitinase gene from *leymus chinensis* improve pathogen resistance and saline-alkali stress tolerance in transgenic tobacco and maize, *Frontiers in Plant Science*, 11: 504.
157. Loc N.H., Hoa N.T.Q., Cuc P.T.K., Quang H.T. (2013), Expression of chitinase (*chi42*) gene from *Trichoderma asperellum* in *Saccharomyces cerevisiae*, *Annals of Biological Research*, 4(9): 15–19.
158. Loc N.H., Quang H. T., Hung N.B., Huy N.D., Phuong T.T.B., Ha T.T.T. (2011), *Trichoderma asperellum* *Chi42* genes encode chitinase, *Mycobiology*, 39(3): 182–186.
159. Lorito M., Woo S.L., Fernandez I.G., Colucci G., Harman G.E., Pintor-Toro J.A., Filippone E., Muccifora S., Lawrence C.B., Zoina A., Tuzun S., Scala F. (1998), Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(14): 7860–7865.
160. Lorito M. (1998), *Chitinolytic enzymes and their genes*. In: Harman G.E. and Kubicek C.P. *Trichoderma and Gliocladium*. Vol.2. *Enzymes, biological control and commercial applications*. Taylor and Francis Ltd. London, pp.73–92.
161. Low L.Y., Yang S.K., Andrew Kok D.X., Ong-Abdullah J., Tan N.P., Lai K.S.

- (2018), Transgenic plants: Gene constructs, vector and transformation method, *New Visions in Plant Science*, 41–61.
162. Lu Y., Wang N., He J., Li Y., Gao X., Huang L., Yan X. (2018), Expression and characterization of a novel chitinase with antifungal activity from a rare actinomycete, *Saccharothrix yanglingensis* Hhs.015, *Protein Expression and Purification*, 143: 45–51.
 163. Lütcke H.A., Chow K.C., Mickel F.S., Moss K.A., Kern H.F., Scheele G.A. (1987), Selection of AUG initiation codons differs in plants and animals. *The EMBO Journal*, 6(1): 43–48.
 164. Manghwar H., Hussain A., Ali Q., Saleem M.H., Abualreesh M.H., Alatawi A., Ali S. Munis M.F.H. (2021), Disease severity, resistance analysis, and expression profiling of pathogenesis-related protein genes after the inoculation of *Fusarium equiseti* in wheat, *Agronomy*, 11(11): 2124.
 165. Manickavasagam M., Subramanyam K., Ishwarya R., Elayaraja D., Ganapathi A. (2015), Assessment of factors influencing the tissue culture-independent *Agrobacterium*-mediated in planta genetic transformation of okra [*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench], *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 123(2): 309–320.
 166. Mariashibu T.S., Subramanyam K., Arun M., Mayavan S., Rajesh M., Theboral J., Manickavasagam M., Ganapathi A. (2013), Vacuum infiltration enhances the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in Indian soybean cultivars, *Acta Physiologiae Plantarum*, 35(1): 41–54.
 167. Marka R., Nanna R.S. (2018), Optimization of factors affecting *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in groundnut (*Arachis hypogaea* L.), *Adv Plants Agric Res*, 8(3): 275.
 168. Marka R., Nanna R. S. (2021), Expression of Tcchitinase-I gene in transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L.) confers enhanced resistance against leaf spot and rust diseases, *Plant Growth Regulation*, 93(1): 53–63.
 169. Marka R., Malothu G.S., Nanna R.S. (2022), Transgenic Peanut (*Arachis hypogaea* L.) Plants Conferring Enhanced Protection Against Fungal Pathogens by Expressing Tc chitinase-I Gene, *Journal of Scientific Research*, 14(2): 625–640.
 170. Martins J.P.R., Schimildt E.R., Alexandre R.S., Santos B.R., Magevski G.C. (2013), Effect of synthetic auxins on in vitro and ex vitro bromeliad rooting, *Pesquisa Agropecuária Tropical*, 43: 138–146.

171. Mayavan S., Subramanyam K., Arun M., Rajesh M., Kapil Dev G., Sivanandhan G., Jaganath B., Manickavasagam M., Selvaraj N., Ganapathi A. (2013), *Agrobacterium tumefaciens*-mediated in planta seed transformation strategy in sugarcane, *Plant Cell Reports*, 32(10): 1557–1574.
172. McKently A.H. (1991), Direct somatic embryogenesis from axes of mature peanut embryos, *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 27(4): 197–200.
173. Miller G.L. (1959), Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Analytical Chemistry*, 31(3): 426–428.
174. Miyashita K., Fujii T., Sawada Y. (1991), Molecular cloning and characterization of chitinase genes from *Streptomyces lividans* 66, *Microbiology*, 137(9): 2065–2072.
175. Mohan C., Jayanarayanan A.N., Narayanan S. (2017), Construction of a novel synthetic root-specific promoter and its characterization in transgenic tobacco plants, *3 Biotech*, 7(4): 1–9.
176. Mora-Escobedo R., Hernández-Luna P., Joaquín-Torres I.C., Ortiz-Moreno A., Robles-Ramírez M.D.C. (2015), Physicochemical properties and fatty acid profile of eight peanut varieties grown in Mexico, *CyTA-Journal of Food*, 13(2): 300–304.
177. Morimoto K., Yoshimoto M., Karita S., Kimura T., Ohmiya K., Sakka K. (2007), Characterization of the third chitinase Chi18C of *Clostridium paraputrificum* M-21, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(5): 1106–1113.
178. Muli J.K., Mweu C., Budambula N., Anami S.E. (2017), Yeast extract peptone based co-cultivation media promotes transient GUS expression in tropical maize genotypes, *Asian Journal of Crop Science*, 9:71–81.
179. Murashige T., Skoog F. (1962), A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiologia Plantarum*, 15(3): 473–497.
180. Murthy N., Bleakley B (2012), Simplified method of preparing colloidal chitin used for screening of chitinase - producing microorganisms, *Internet Journal of Microbiology*, 10(2): e2bc3.
181. Murthy P.S., Kumari J.P.R., Basavaraju N., Janardhan D., Devamma M.N. (2018), In vitro influence of bio-controlling agents against *Sclerotium rolfsii* causing stem rot sickness of groundnut (*Arachis hypogaea* L.), *Journal of Pharmaceutical Innovation*, 7: 05–08.
182. NNan A.S.D., Koffi N.K., Anthony O.A., Hortense D.O.D.O. (2020), Improving peanut protein quality: Expression of a synthetic storage protein, *African Journal of Biotechnology*, 19(5): 265–275.

183. Nadarajah K., Ali H.Z., Omar N.S. (2014), The isolation and characterization of an endochitinase gene from a Malaysian isolate of 'Trichoderma sp.', *Australian Journal of Crop Science*, 8(5).
184. Nagpure A., Choudhary B., Gupta R.K. (2014), Chitinases: in agriculture and human healthcare, *Critical Reviews in Biotechnology*, 34(3): 215–232.
185. Nakagawa T., Kurose T., Hino T., Tanaka K., Kawamukai M., Niwa Y., Toyooka K., Matsuoka K., Jinbo T., Kimura T. (2007), Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 104(1): 34–41.
186. Nan L., Lin H., Guan Y., Chen F. (2002), Functional analysis of cis-acting sequences regulating root-specific expression in transgenic tobacco, *Chinese Science Bulletin*, 47(17): 1441–1445.
187. Nandakumar R., Babu S., Kalpana K., Raguchander T., Balasubramanian P., Samiyappan R. (2007), *Agrobacterium*-mediated transformation of indica rice with chitinase gene for enhanced sheath blight resistance, *Biologia Plantarum*, 51(1): 142–148.
188. Nandini D., Mohan J.S.S., Singh G. (2010), Induction of systemic acquired resistance in *Arachis hypogaea* L. by *Sclerotium rolfsii* derived elicitors, *Journal of Phytopathology*, 158(9): 594–600.
189. Nasr-Alla A.E., Osman F.A.A, Soliman K.G. (1998), Effect of increased phosphorus, potassium or sulfur application in their different combinations on yield, yield components and chemical composition of peanut in a newly reclaimed sand soil, *Zagazig Journal of Agricultural Research (Egypt)*.
190. National Institute of Nutrition (NIN) (2017), https://drive.google.com/file/d/leqQ578gHiPoIaHaVYjQa_3sFe_LzGhml/view. accessed on 07.09.2020.
191. Norkunas K., Harding R., Dale J., Dugdale B. (2018), Improving agroinfiltration-based transient gene expression in *Nicotiana benthamiana*, *Plant Methods*, 14(1): 1–14.
192. Nyaboga E., Tripathi J.N., Manoharan R., Tripathi L. (2014), *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of yam (*Dioscorea rotundata*): an important tool for functional study of genes and crop improvement, *Frontiers in Plant Science*, 5(463): 1–14.

193. Ojaghian S., Wang L., Xie G.L., Zhang J.Z. (2018), Increased resistance against storage rot in transgenic carrots expressing chitinase *chit42* from *Trichoderma harzianum*, *Scientia Horticulturae*, 234(14): 81–86.
194. Okay S., Özdal M., Kurbanoglu E.B. (2013), Characterization, antifungal activity, and cell immobilization of a chitinase from *Serratia marcescens* MO-1, *Turkish Journal of Biology*, 37(6): 639–644.
195. Olhoft P.M., Fligel L.E., Donovan C.M., Somers D.A. (2003), Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method, *Planta*, 216(5): 723–735.
196. Orlikowska T.K., Cranston H.J., Dyer W.E. (1995), Factors influencing *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and regeneration of the safflower cultivar ‘Centennial’, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 40(1): 85–91.
197. Özkan H., Aasim M. (2019), Potential of pretreated explants of peanut (*Arachis hypogaea* Linn.) to micropropagation under in vitro conditions, *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 56(3): 775–780.
198. Ozudogru E.A., Ozden-Tokatli Y., Akcin A. (2005), Effect of silver nitrate on multiple shoot formation of Virginia-type peanut through shoot tip culture, *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 41(2): 151–156.
199. Pal K.K., Dey R., Tilak K.V.B.R. (2014), Fungal diseases of groundnut: control and future challenges, *In Future Challenges in Crop Protection Against Fungal Pathogens* (pp. 1–29), Springer, New York.
200. Palanivel S., Jayabalan N. (2002), Direct multiple shoot induction from different mature seed explants of groundnut (*Arachis hypogaea* L.), *Philippine Journal of Science*, 131(2): 127–136.
201. Palanivel S., Parvathi S., Muniappan V., Deepa C., Abuthahir A. (2014), *Arachis hypogaea* L. Direct Organogenesis and SDS-PAGE Analysis in Groundnut, *British Biotechnology Journal*, 4(6): 720–732.
202. Pandian R.T.P., Raja M., Sharma P. (2018), Characterization of three different chitinase genes from *Trichoderma asperellum* strain Ta13, *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 88(4): 1661–1668.
203. Parilli-Moser I., Hurtado-Barroso S., Guasch-Ferré M., Lamuela-Raventós R.M. (2022), Effect of Peanut Consumption on Cardiovascular Risk Factors: A Randomized Clinical Trial and Meta-Analysis, *Frontiers in Nutrition*, 9.

204. Park B.J., Liu Z., Kanno A., Kameya T. (2005), Transformation of radish (*Raphanus sativus* L.) via sonication and vacuum infiltration of germinated seeds with *Agrobacterium* harboring a group 3 LEA gene from *B. napus*, *Plant Cell Reports*, 24(8): 494–500.
205. Patil N.S., Waghmare S.R., Jadhav J.P. (2013), Purification and characterization of an extracellular antifungal chitinase from *Penicillium ochrochloron* MTCC 517 and its application in protoplast formation, *Process Biochemistry*, 48(1):176–183.
206. Patil R.S., Ghormade V., Deshpande M.V. (2000), Chitinolytic enzymes: an exploration, *Enzyme and Microbial Technology*, 26(7): 473–483.
207. Paul N.C., Hwang E.J., Nam S.S., Lee H.U., Lee J.S., Yu G.D., Kang Y.G., Lee K.B., Go S., Yang J.W. (2017), Phylogenetic placement and morphological characterization of *Sclerotium rolfsii* (teleomorph: *Athelia rolfsii*) associated with blight disease of *Ipomoea batatas* in Korea, *Mycobiology*, 45: 129–138.
208. Paulsen S.S., Andersen B., Gram L., Machado H. (2016), Biological potential of chitinolytic marine bacteria, *Marine Drugs*, 14(2): 230.
209. Peeters A. J., Gerards W., Barendse G.W., Wullems G.J. (1991), *In vitro* flower bud formation in tobacco: interaction of hormones, *Plant Physiology*, 97(1): 402–408.
210. Peltier A.J., Bradley C.A., Chilvers M.I., Malvick D.K., Mueller D.S., Wise K.A., Esker P.D. (2012), Biology, yield loss and control of Sclerotinia stem rot of soybean, *Journal of Integrated Pest Management*, 3(2): B1–B7.
211. Pérez-González A., Caro E. (2019), Benefits of Using Genomic Insulators Flanking Transgenes to Increase Expression and Avoid Positional Effects, *Scientific Reports*, 9(1): 1–11.
212. Perlak F.J., Fuchs R.L., Dean D.A., McPherson S.L., Fischhoff D.A. (1991), Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(8): 3324–3328.
213. Prasad K., Bhatnagar-Mathur P., Waliyar F., Sharma K. K. (2013), Overexpression of a Chitinase Gene in Transgenic Peanut Confers Enhanced Resistance to Major Soil Borne and Foliar Fungal Pathogens, *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 22: 222–233.
214. Prasad R. D., Naik M.K. (2008), Advances in plant diseases caused by *Sclerotium rolfsii* and their management, *Advances in Soil Orne Plant Diseases*, 89–127.
215. Punja Z.K., Rahe J.E. (1993), *Sclerotium*. In *Methods for research on soilborne phytopathogenic fungi* eds. Singleton L.L., Mihail J.D., Rush C.M., St. Paul,

Minnesota: The American Phytopathological Society.

216. Punja Z.K., Zhang Y.Y. (1993), Plant chitinases and their roles in resistance to fungal diseases, *Journal of Nematology*, 25: 526–540.
217. Qiagen. *pQE-30 (map)*. [Online] 2020 [5/03/2020]. Available from: <http://www.helmholtzmuenchen.de/fileadmin/PEPF/pQEvectors/pQE30map.pdf>
218. Qiusheng Z., Bao J., Likun L., Xianhua X. (2005), Effects of antioxidants on the plant regeneration and GUS expressive frequency of peanut (*Arachis hypogaea*) explants by *Agrobacterium tumefaciens*, *Plant cell, Tissue and Organ Culture*, 81(1): 83–90.
219. Raaijmakers J.M., De Bruijn I., Nybroe O., Ongena M. (2010), Natural functions of lipopeptides from *Bacillus* and *Pseudomonas*: more than surfactants and antibiotics, *FEMS Microbiology Reviews*, 34(6): 1037–1062.
220. Radhakrishnan T., Murthy T.G.K., Chandran K., Bandyopadhyay A. (2000), Micropropagation in peanut (*Arachis hypogaea* L.), *Biologia Plantarum*, 43(3): 447–450.
221. Rajasekaran S., Sivagnanam K., Subramanian S. (2005), Antioxidant effect of *Aloe vera* gel extract in streptozotocin-induced diabetes in rats, *Pharmacological Report*, 57(1): 90–96.
222. Ramírez M.V., Calzadía L., Dhanasekaran D., Jiang Y. (2016), Industrial enzymes and metabolites from actinobacteria in food and medicine industry. *Actinobacteria: Basics and Biotechnological Application. INTECH. World's largest Science, Technology & Medicine*, 315–328.
223. Rasool R., Kamili A.N., Ganai B.A., Akbar S. (2009), Effect of BAP and NAA on shoot regeneration in *Prunella vulgaris*, *Journal of Natural Sciences and Mathematics*, 3(1): 21–26.
224. Ray L., Panda A.N., Mishra S.R., Pattanaik A.K., Adhya T.K., Suar M., Raina V. (2019), Purification and characterization of an extracellular thermo-alkali stable, metal tolerant chitinase from *Streptomyces chilikensis* RC1830 isolated from a brackish water lake sediment, *Biotechnology Reports*, 21: e00311.
225. Riordan J.F. (1977), The role of metals in enzyme activity, *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 7:119–129.
226. Rocha-Pino Z., Viguera G., Shirai K. (2011), Production and activities of chitinases and hydrophobins from *Lecanicillium lecanii*, *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 34(6): 681–686.

227. Rohini V.K., Sankara Rao K. (2000), Transformation of peanut (*Arachis hypogaea* L.): a non-tissue culture based approach for generating transgenic plants, *Plant Science*, 150(1): 41–49.
228. Rohini V.K., Rao K.S. (2001), Transformation of peanut (*Arachis hypogaea* L.) with tobacco chitinase gene: variable response of transformants to leaf spot disease, *Plant Science*, 160(5): 889–898.
229. Ros E., Singh A., O’Keefe J.H. (2021), Nuts: Natural pleiotropic nutraceuticals, *Nutrients*, 13(9): 3269.
230. Sambrook S., Russell D.W. (2003), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, New York.
231. Sandhya C., Adapa L.K., Nampoothiri K.M., Binod P., Szakacs G., Pandey A. (2004), Extracellular chitinase production by *Trichoderma harzianum* in submerged fermentation. *Journal of Basic Microbiology: An International Journal on Biochemistry, Physiology, Genetics, Morphology, and Ecology of Microorganisms*, 44(1): 49–58.
232. Santos-Moriano P., Kidibule P.E., Alleyne E., Ballesteros A.O., Heras A., Fernandez-Lobato M., Plou F.J. (2018), Efficient conversion of chitosan into chitooligosaccharides by a chitosanolytic activity from *Bacillus thuringiensis*, *Process Biochemistry*, 73: 102–108.
233. Saranya R., Anadani V.B., Akbari L.F., Vanthana M. (2017), Management of black mold of onion [*Aspergillus niger* (Van Teigh)] by using various fungicides, *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6:1621–1627.
234. Sarkar T., Thankappan R., Kumar A., Mishra G.P., Dobaria J.R. (2016), Stress inducible expression of AtDREB1A transcription factor in transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L.) conferred tolerance to soil-moisture deficit stress, *Frontiers in Plant Science*, 7: 935.
235. Savage G.P., Keenan J.I. (1994), The composition and nutritive value of groundnut kernels. In: J. SMARTT, ed., *The groundnut crop: A scientific basis for improvement*, Dordrecht:Springer, pp. 173–213.
236. Sayed O.H. (2003), Chlorophyll fluorescence as a tool in cereal crop research, *Photosynthetica*, 41(3): 321–330.
237. Schäfer T., Hanke M.V., Flachowsky H. (2012), Chitinase activities, scab resistance, mycorrhization rates and biomass of own-rooted and grafted transgenic apple, *Genetics and Molecular Biology*, 35:466–473.

238. Seidl V., Huemer B., Seiboth B., Kubicek C.P. (2005), A complete survey of *Trichoderma* chitinases reveals three distinct subgroups of family 18 chitinases, *The FEBS Journal*, 272(22): 5923–5939.
239. Shah M.K.N. (2014), Comparison of nutritional value of transgenic peanut expressing bar and *rcg3* genes with non-transgenic counterparts, *Pakistan Journal of Botany*, 46(5): 1539–1542.
240. Shah S.H., Jan S.A., Ahmad N., Khan S.U., Kumar T., Iqbal A., Nasir F., Noman M., Uzma, Ali U.A. (2015), Use of different promoters in transgenic plant development: current challenges and future perspectives, *American-Eurasian Journal of Agricultural & Environmental Sciences*, 15: 664–675.
241. Sharma P., Sharma M., Srivastava M. (2014), Heterologous expression and characterization of purified partial endochitinase (ech- 42) isolated from *Trichoderma harzianum*, *African Journal of Biotechnology*, 13:2159–2165.
242. Sharma A.K., Sharma M.K. (2009), Plants as bioreactors: recent developments and emerging opportunities, *Biotechnology Advances*, 27(6): 811–832.
243. Sharma K.K., Anjaiah V. (2000), An efficient method for the production of transgenic plants of peanut (*Arachis hypogaea* L.) through *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation, *Plant Science*, 159(1), 7–19.
244. Shokes F.M., Róźalski K., Gorbet D.W., Brenneman T.B., Berger D.A. (1996), Techniques for inoculation of peanut with *Sclerotium rolfsii* in the greenhouse and field, *Peanut Science*, 23: 124–128.
245. Shubakov A.A., Kucheryavykh P.S. (2004), Chitinolytic activity of filamentous fungi, *Applied Biochemistry and Microbiology*, 40(5): 445–447.
246. Singh A., Mehta S., Singh H.B., Nautiyal C.S. (2003), Biocontrol of collar rot disease of betelvine (*Piper betle* L.) caused by *Sclerotium rolfsii* by using rhizosphere-competent *Pseudomonas fluorescens* NBRI-N6 and P-fluorescens NBRI-N, *Current Microbiology*, 47(2): 153–158.
247. Singh G., Sarkar N.K., Grover A. (2021), Hsp70, sHsps and ubiquitin proteins modulate HsfA6a-mediated Hsp101 transcript expression in rice (*Oryza sativa* L.). *Physiologia Plantarum*, 173(4): 2055–2067.
248. Singh S., Hazra S. (2009), Somatic embryogenesis from the axillary meristems of peanut (*Arachis hypogaea* L.), *Plant Biotechnology Reports*, 3(4): 333–340.
249. Sjahril R., Chin D.P., Khan R.S., Yamamura S., Nakamura I., Amemiya Y., Mii M. (2006), Transgenic *Phalaenopsis* plants with resistance to *Erwinia carotovora*

- produced by introducing wasabi defensin gene using *Agrobacterium* method, *Plant Biotechnology*, 23(2): 191–194.
250. Sobolev V.S., Khan S.I., Tabanca N., Wedge D.E., Manly S.P., Cutler S. J., Coy M.R., Becnel J.J., Neff S.A., Gloer J.B. (2011), Biological activity of peanut (*Arachis hypogaea*) phytoalexins and selected natural and synthetic stilbenoids, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(5): 1673–1682.
 251. Somanaboina A.K., Narasu L.N., Varshney R.K., Kavi Kishor P.B. (2017), Development of transgenic tomato (*Solanum lycopersicum* L.) by heterologous expression of osmotin-like protein (OLP) and chitinase (*Chi11*) genes for salt and drought stress tolerance, In: Inter Drought-V, February 21-25, Hyderabad, India.
 252. Somssich M. (2019), *A short history of the CaMV 35S promoter* (No. e27096v3). PeerJ Preprints.
 253. Sonntag K., Döscher B., Sellner M. (2001), Genotype Effects on *Agrobacterium* Mediated Genetic Transformation of *Brassica napus*, *Acta Horticulturae*, 560: 215–218.
 254. Staufenberger T., Imhoff J.F., Labes A. (2012), First crenarchaeal chitinase found in *Sulfolobus tokodaii*, *Microbiological Research*, 167(5): 262–269.
 255. Stockhaus J., Schell J., Willmitzer L. (1989), Correlation of the expression of the nuclear photosynthetic gene ST S1 with the presence of chloroplasts. *EMBO Journal*, 8: 2445–2451.
 256. Subramanyam K., Rajesh M., Jaganath B., Vasuki A., Theboral J., Elayaraja D., Karthik S., Manickavasagam M., Ganapathi A. (2013), Assessment of factors influencing the *Agrobacterium*-mediated in planta seed transformation of brinjal (*Solanum melongena* L.), *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171(2): 450–468.
 257. Subramoni S., Nathoo N., Klimov E., Yuan Z.C. (2014), *Agrobacterium tumefaciens* responses to plant-derived signaling molecules, *Frontiers in Plant Science*, 5: 322.
 258. Sukanto, Wahyono D. (2013), Identifikasi dan Kkarakterisasi *Sclerotium rolfsii* Sacc. penyebab penyakit busuk batang nilam (*Pogostemon cablin* Benth), *Buletin Penelitian Tanaman Rempah dan Obat*, 24(1): 35–41.
 259. Tabaeizadeh Z., Agharbaoui Z., Harrak H., Poysa V. (1999), Transgenic tomato plants expressing a *Lycopersicon chilense* chitinase gene demonstrate improved resistance to *Verticillium dahliae* race 2, *Plant Cell Reports*, 19(2): 197–202.

260. Tang W.J., Fernandez J.G., Sohn J.J., Amemiya C.T. (2015), Chitin is endogenously produced in vertebrates, *Current Biology*, 25(7): 897–900.
261. Thiessen L.D., Woodward J.E. (2012), Diseases of peanut caused by soilborne pathogens in the Southwestern United States, *International Scholarly Research Notices*.
262. Thirumalaisamy P.P., Kumar N., Radhakrishnan T., Rathnakuma, A.L., Bera S.K., Jadon K.S., Mishra G.P., Rajyaguru R., Joshi B. (2015), Phenotyping of groundnut genotypes for resistance to *Sclerotium* stem rot, *Journal of Mycology and Plant Pathology*, 44: 459–462.
263. Tiwari R., Chandra K., Shukla S.K., Jaiswal V.P., Amaresan N., Srivastava A.K., Gaur A., Sahni D., Tiwari R.K. (2022), Interference of bio-control *Trichoderma* to enhance physical and physiological strength of sugarcane during Pokkah boeng infection, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 38(8): 1–14.
264. Tiwari S., Tuli, R. (2008), Factors promoting efficient in vitro regeneration from de-embryonated cotyledon explants of *Arachis hypogaea* L, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 92(1): 15–24.
265. Tiwari S., Verma P.C., Singh P.K., Tuli R. (2009), Plants as bioreactors for the production of vaccine antigens, *Biotechnology Advances*, 27(4): 449–467.
266. Tiwari V., Chaturvedi A.K., Mishra A., Jha B. (2015), An efficient method of Agrobacterium-mediated genetic transformation and regeneration in local Indian cultivar of groundnut (*Arachis hypogaea*) using grafting, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 175(1): 436–453.
267. Tonelli M.L., Taurian T., Ibáñez F., Angelini J., Fabra A. (2010), Selection and *in vitro* characterization of biocontrol agents with potential to protect peanut plants against fungal pathogens, *Journal of Plant Pathology*, 73–82.
268. Toomer O.T. (2018), Nutritional chemistry of the peanut (*Arachis hypogaea*), *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58(17): 3042–3053.
269. Torres K.C. (1989), *Tissue Culture Techniques to Horticultural Crops*, New York: Van Nostrand Reinhold.
270. Toufiq N., Tabassum B., Bhatti M.U., Khan A., Tariq M., Shahid N., Nasir I.A., Husnain T. (2018), Improved antifungal activity of barley derived chitinase I gene that overexpress a 32 kDa recombinant chitinase in *Escherichia coli* host, *Brazilian Journal of Microbiology*, 49:414–421.
271. Tsuda K., Suzuki T., Mimura M., Nonomura K.I. (2022), Comparison of

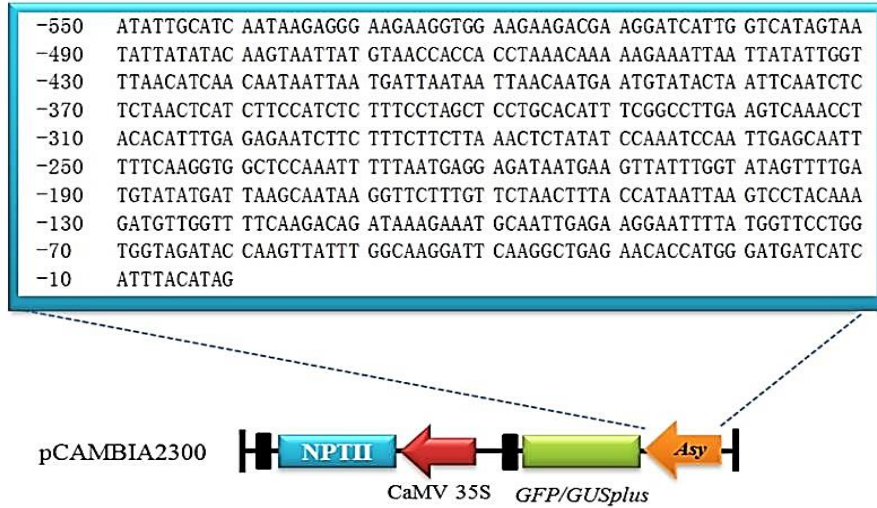
- constitutive promoter activities and development of maize ubiquitin promoter-and Gateway-based binary vectors for rice, *Plant Biotechnology*, 22-0120.
272. Tsujibo H., Hatano N., Mikami T., Hirasawa A., Miyamoto K., Inamori Y. (1998), A novel β -N-acetylglucosaminidase from *Streptomyces thermoviolaceus* OPC-520: Gene cloning, expression and assignment to family 3 of the glycosyl hydrolases, *Applied and Environmental Microbiology*, 64: 2920–2924.
273. Ulhoa C.J., Peberdy J.F. (1991), Regulation of chitinase synthesis in *Trichoderma harzianum*, *Microbiology*, 137(9): 2163–2169.
274. Uranbey S., Sevimay C.S., Kaya M.D., Ipek A., Sancak C.E.N.G.İ.Z., Başalma D., Er, C., Özcan S. (2005), Influence of different co-cultivation temperatures, periods and media on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer, *Biologia Plantarum*, 49(1): 53–57.
275. USDA (2020), *Oilseeds and Products Annual*, Report Number: VM2020-0026 (accessed on 01 April 2020).
276. USDA (2021), Foreign Agricultural Service, Geospatial Data. <http://ipad.fas.usda.gov> (accessed on 15 August 2022).
277. USDA (2021), Oilseeds: World markets and trade <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/oilseeds.pdf> (2021) (accessed on April 2021).
278. USDA (2022), National Nutrient Database for Standard Reference, Legacy Release, <https://data.nal.usda.gov/dataset/usda-national-nutrient-database-standard-reference-legacy-release> (accessed on 01 June 2022).
279. Van Haute E., Joos H., Maes M., Warren G., Van Montagu M., Schell J. (1983), Intergeneric transfer and exchange recombination of restriction fragments cloned in pBR322: A novel strategy for the reversed genetics of the Ti plasmids of *Agrobacterium tumefaciens*, *The EMBO Journal*, 2(3): 411–417.
280. Vasavirama K., Kirti P.B. (2012), Increased resistance to late leaf spot disease in transgenic peanut using a combination of PR genes, *Functional & integrative genomics*, 12(4): 625–634.
281. Veluthakkal R., Dasgupta M.G. (2015), *Agrobacterium*-mediated transformation of chitinase gene from the actinorhizal tree *Casuarina equisetifolia* in *Nicotiana tabacum*, *Biologia* 70(7): 905–914.
282. Verma A., Mahatma M.K., Singh A.L., Singh S., Bishi S.K., Thawait L. K., ... & Radhakrishnan, T. (2020). P4N: *Peanut for Nutrition*. ICAR – Directorate of Groundnut Research, Junagadh, Gujarat, India Technical Bulletin, 2: 26.

283. Voinnet O., Rivas S., Mestre P., Baulcombe D. (2003), An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus, *The Plant Journal*, 33(5): 949–956.
284. Wang S.L., Chang W.T. (1997), Purification and characterization of two bifunctional chitinase/lysozymes extracellularly produced by *Pseudomonas aeruginosa* K-187 in a shrimp and crab shell powder medium, *Applied and Environmental Microbiology*, 63: 380–386.
285. Wonglom P., Daengsuwan W., Ito S.I., Sunpapao A. (2019), Biological control of *Sclerotium* fruit rot of snake fruit and stem rot of lettuce by *Trichoderma* sp. T76-12/2 and the mechanisms involved, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 107: 1–7.
286. Wright D.L., Marois J.J., George S., Grabau Z., Barocco R., Small I. (2022), Use of Perennial Grasses in Peanut/Cotton Rotations for Integrated Management of Nematodes, Diseases, and Weeds: SS-AGR-125/AG257, rev. 9/2022. *EDIS*, 2022(4).
287. Wu H., Wang Q., Ma T., Ren J. (2009), Comparative studies on the functional properties of various protein concentrate preparations of peanut protein, *Food Research International*, 42(3): 343–348.
288. Wu J., Wang Y., Kim S.T., Kim S.G., Kang K.Y. (2013), Characterization of a newly identified rice chitinase-like protein (OsCLP) homologous to xylanase inhibitor, *BMC biotechnology*, 13(1): 1–8.
289. Wu Q., Sun R., Ni M., Yu J., Li Y., Yu C., Dou K., Ren J., Chen J. (2017), Identification of a novel fungus, *Trichoderma asperellum* GDFS1009, and comprehensive evaluation of its biocontrol efficacy, *PLoS ONE*, 12(6): e0179957.
290. Xia J.L., Xiong J., Xu T., Zhang C.G., Zhang R.Y., Zhang Q., Qiu, G. Z. (2009). Purification and characterization of extracellular chitinase from a novel strain *Aspergillus fumigatus* CS-01, *Journal of Central South University of Technology*, 16(4): 552–557.
291. Xu X., Guo S., Chen K., Song H., Liu J., Guo L., Qian Q., Wang, H. (2010), A 796 bp *PsPR10* gene promoter fragment increased root-specific expression of the *GUS* reporter gene under the abiotic stresses and signal molecules in tobacco, *Biotechnology Letters*, 32(10): 1533–1539.
292. Yamamoto T., Hoshikawa K., Ezura K., Okazawa R., Fujita S., Takaoka M., Mason H.S., Ezura H., Miura K. (2018), Improvement of the transient expression system for production of recombinant proteins in plants, *Scientific reports*, 8(1): 1–10.

293. Yan L., Wang Z., Song W., Fan P., Kang Y., Lei Y., Wan L., Huai D., Chen Y., Wang X., Sudini H., Liao B. (2021), Genome sequencing and comparative genomic analysis of highly and weakly aggressive strains of *Sclerotium rolfsii*, the causal agent of peanut stem rot, *BMC Genomics*, 22(1): 1–15.
294. Yang S., Fu X., Yan Q., Guo Y., Liu Z., Jiang Z. (2016), Cloning, expression, purification and application of a novel chitinase from a thermophilic marine bacterium *Paenibacillus barengoltzii*, *Food Chemistry*, 192: 1041–1048.
295. Zahran H.A., Tawfeuk H.Z. (2019), Physicochemical properties of new peanut (*Arachis hypogaea* L.) varieties, *Oilseeds and Fats, Crops and Lipids*, 26: 19.
296. Zarei M., Aminzadeh S., Zolgharnein H., Safahieh A., Daliri M., Noghabi K.A., Ghoroghi A., Motallebi A. (2011), Characterization of a chitinase with antifungal activity from a native *Serratia marcescens* B4A, *Brazilian Journal of Microbiology*, 42: 1017–1029.
297. Zeng X.F., Li L., Li J.R., Zhao D.G. (2016), Constitutive expression of *McCHIT1-PAT* enhances resistance to rice blast and herbicide, but does not affect grain yield in transgenic glutinous rice, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 63(1): 77–78.
298. Zhao H., Tan Z., Wen X., Wang Y. (2017), An improved syringe agroinfiltration protocol to enhance transformation efficiency by combinative use of 5-azacytidine, ascorbate acid and Tween-20, *Plants* 6(1): 9.
299. Zivarpour P., Reiner Ž., Hallajzadeh J., Mirsafaei L. (2022), Resveratrol and cardiac fibrosis prevention and treatment, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 23(2): 190–200.

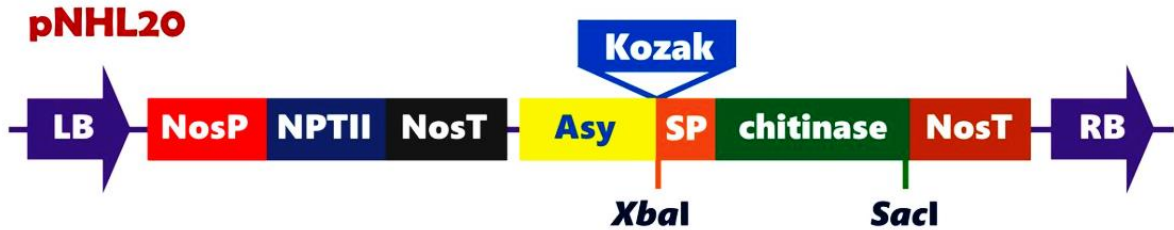
PHỤ LỤC

Phụ lục 1. Sơ đồ vector pCAMBIA2300 chứa promoter *Asy* đặc hiệu rễ (GenBank No. JQ780692) (Geng và cs, 2014).



Hình P.1. Vector pCAMBIA2300 chứa promoter *Asy*

Phụ lục 2.



Hình P.2. Peptide tín hiệu của gen amylase 3D ở lúa (Jung và cs, 2016) nằm ở đầu 5' của gen để định hướng chitinase mới được tổng hợp đến vùng ngoại vi để tiết ngoại bào.

Phụ lục 3. Thành phần môi trường cơ bản MS

	Thành phần	Nồng độ (g/L)
MS ₁	KNO ₃	95
	KH ₂ PO ₄	8,5
	Đa lượng	
	NH ₄ NO ₃	82,5
	MgSO ₄ .7H ₂ O	18,5
MS ₂	CaCl ₂ .2H ₂ O/CaCl ₂	44/32,2237
	H ₃ PO ₃	0,62
MS ₃	MnSO ₄ .2H ₂ O/MnSO ₄	2,23/1,69
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0,0025
	CuSO ₄ .5H ₂ O	0,0025

Vi lượng		
	ZnSO ₄ .2H ₂ O/ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,86/1,06
	Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,025
	KI	0,083
MS ₄	FeSO ₄ .7H ₂ O	2,78
	Na ₂ -EDTA	3,73
Vitamine		
	Myo-inositol/inositol	10/20
	Thiamine.HCl (B1)	0,01
MS ₅	Pyridoxine.HCl (B2)	0,05
	Nicotinic acid	0,05
Amino acid		
	Glycine	0,2

Phụ lục 4. Môi trường nuôi cấy vi khuẩn, nấm

Môi trường		Thành phần
LB	1% tryptone; 0,5% dịch chiết nấm men; 1% NaCl	
YEP	1% tryptone; 1% dịch chiết nấm men; 0,5% NaCl	
PDA	200 g khoai tây; 20 g dextrose; 20 g agar; 1000 mL nước cất	

Phụ lục 5. Các dung dịch trong điện di SDS-PAGE

Dung dịch	Thành phần
Dung dịch acrylamide 30%	<ol style="list-style-type: none"> 29 g acrylamide 1 g N,N'-methylenebisacrylamide (bisacrylamide) Hòa tan trong 60 mL nước cất, định mức lên 100 mL Sau khi lọc, bảo quản ở 4⁰C trong chai tối màu
Đệm separating gel 4x 1,5 M Tris (pH 8.8) 0,4% SDS	<ol style="list-style-type: none"> 2 M Tris 75 mL + 10% SDS 4 mL Định mức lên 100 mL bằng nước cất (bảo quản ở 4⁰C)
Đệm stacking gel 4x 0,5 M Tris (pH 6.8) 0,4% SDS	<ol style="list-style-type: none"> 1 M Tris 50 mL + 10% SDS 4 mL Định mức lên 100 mL bằng nước cất (bảo quản ở 4⁰C)
Đệm mẫu 4x 33% glycerol 10% SDS 0,25% bromophenol blue	<ol style="list-style-type: none"> 4 mL glycerol 2 mL 2-mercaptoethanol 1,2 g SDS 5 mL đệm stacking gel 4x 0,03 g bromophenol blue Bảo quản ở -20 ⁰ C
Đệm điện di 0,025 M Tris 0,192 M glycine 0,1% SDS	<ol style="list-style-type: none"> Tris 3 g + glycine 14,4 g + SDS 1g Định mức lên 1 L bằng nước cất Chính pH đến 8,3 - 8,8 bằng HCl

Dung dịch nhuộm gel (1 L)	<ol style="list-style-type: none"> 1. Coomassie Brilliant Blue R250: 2,5 g 2. methanol: 450 mL 3. nước cất: 450 mL 4. glacial acetic acid: 100 mL 5. Lọc dung dịch bằng bộ lọc Whatman No.1.
Dung dịch rửa gel (1 L)	<ol style="list-style-type: none"> 1. methanol: 300 mL 2. glacial acetic acid: 100 mL 3. nước cất: 600 mL
Dung dịch APS 10%	Hòa tan 1 g APS trong 10 mL nước cất

Phụ lục 6. Các dung dịch trong kỹ thuật Western blot

Dung dịch	Thành phần
Đệm chuyển (pH 8,3) (1 L) 25 mM Tris 192 mM glycine 20% methanol	<ol style="list-style-type: none"> 1. Tris: 3.03 g 2. glycine: 14,4 g 3. methanol: 200 mL
Đệm blocking (500 mL) 1-5% skim milk 0,01% Tween 20	<ol style="list-style-type: none"> 1. skim milk: 25 g 2. Tween 20: 50 μL 3. Hòa tan trong đệm TBST
Đệm PBS (pH 7,0)	<ol style="list-style-type: none"> 1. NaCl: 8 g 2. KCl: 0,2 g 3. Na₂HPO₄: 1,44 g 4. KH₂PO₄: 0,24 g 5. Chỉnh pH với NaOH và thêm 1 L nước cất
Đệm TBST (500 mL) 100 mM Tris (pH 7,5) 0,9% NaCl 0,1% Tween 20	<ol style="list-style-type: none"> 1. 1 M Tris (pH 7,5): 50 mL 2. NaCl: 4,5 g 3. Tween 20: 500 μL
Dung dịch TMN 100 mM Tris (pH 9,5) 100 mM NaCl 5 mM MgCl ₂	<ol style="list-style-type: none"> 1. 1 M Tris (pH 9,5): 50 mL 2. 5 M NaCl: 10 mL 3. 1 M MgCl₂: 2,5 mL