

BỘ GIÁO DỤC VÀ ĐÀO TẠO    BỘ NÔNG NGHIỆP VÀ PHÁT TRIỂN NÔNG THÔN  
VIỆN KHOA HỌC NÔNG NGHIỆP VIỆT NAM

HÀ VĂN CHIẾN

**NGHIÊN CỨU VAI TRÒ CỦA CÁC YẾU TỐ  
PHIÊN MÃ ĐÁP ỨNG AUXIN (GmARF) Ở ĐẬU  
TƯƠNG VÀ STRIGOLACTONE Ở *ARABIDOPSIS*  
TRONG CHỊU HẠN VÀ MẶN**

*Chuyên ngành* : Công nghệ sinh học

*Mã số* : 62. 42. 02. 01

**TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ NÔNG NGHIỆP**

HÀ NỘI - 2016

Công trình được hoàn thành tại:

Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

Người hướng dẫn khoa học:

1. PGS.TS. Nguyễn Văn Đồng
2. TS. Trần Phan Lam Sơn

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án sẽ được bảo vệ trước hội đồng chấm luận án cấp Viện họp tại  
Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam ngày.....tháng..... năm....

Có thể tìm hiểu luận án tại thư Viện:

1. Thư viện Quốc gia
2. Thư viện Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam
3. Thư viện Viện Di truyền Nông nghiệp

# MỞ ĐẦU

## 1. Tính cấp thiết của đề tài

Sự gia tăng dân số một cách nhanh chóng làm cho vấn đề an ninh lương thực trở thành vấn đề chính của thế giới nói chung và Việt Nam nói riêng. Thêm vào đó, sản lượng và sự phát triển của nền sản xuất nông nghiệp bền vững cũng đang bị đe dọa bởi ảnh hưởng của hiện tượng biến đổi khí hậu và các điều kiện bất lợi (như hạn, ngập úng, dịch bệnh, sỏi mòn đất và ô nhiễm môi trường). Sự hiểu biết về cơ chế đáp ứng với các điều kiện bất lợi của thực vật sẽ giúp chúng ta có thể tạo ra được các giống cây trồng có khả năng thích nghi cao hơn. Các nhân tố phiên mã và các loại hormone thực vật (như Abscisic acid (ABA), auxin, cytokinins (CK), strigolactones (SL)) được biết đến với vai trò quan trọng trong điều hòa biểu hiện gen và các quá trình sinh lý của thực vật. Do vậy, nghiên cứu của chúng tôi sẽ tập trung mô tả và xác định các gen có tiềm năng ứng dụng trong việc chọn tạo giống cây trồng có khả năng chống chịu lại các điều kiện bất lợi của môi trường bằng 2 con đường. Một là, nghiên cứu điều hòa biểu hiện gen thông qua các nhân tố phiên mã, cụ thể là họ các yếu tố phiên mã đáp ứng auxin (ARF); và hai là, nghiên cứu quá trình sinh tổng hợp hormone thực vật nhằm phát hiện các gen tham gia vào quá trình trao đổi và dẫn truyền tín hiệu của hormone ở thực vật. Để đạt được mục tiêu này, chúng tôi đồng thời tiến hành nghiên cứu trên các cây mô hình *Arabidopsis thaliana* và cây trồng có vai trò quan trọng đó là đậu tương (*Glycine max*) với đề tài: Nghiên cứu vai trò của các yếu tố phiên mã đáp ứng auxin (GmARF) ở đậu tương và strigolactone ở *Arabidopsis* trong chịu hạn và mặn.

## 2. Mục tiêu nghiên cứu của đề tài

- Xác định được các gen tiềm năng mã hóa các yếu tố phiên mã đáp ứng auxin ở đậu tương (GmARF) phục vụ công tác chọn tạo giống cây trồng mới có khả năng chống chịu điều kiện hạn bằng công nghệ gen.

- Đánh giá vai trò của SL trong sự đáp ứng với điều kiện hạn và mặn ở mức độ kiểu hình và mức độ phân tử.

## 3. Nội dung nghiên cứu của đề tài

### 3.1. Nghiên cứu vai trò của các yếu tố phiên mã đáp ứng auxin trong điều kiện hạn ở đậu tương

### 3.2. Nghiên cứu vai trò của strigolactone trong điều kiện hạn, mặn ở *Arabidopsis*

## 4. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn

### 4.1. Ý nghĩa khoa học

Nghiên cứu của chúng tôi là nghiên cứu đầu tiên, cung cấp các dữ liệu khoa học về vai trò của các gen mã hóa yếu tố phiên mã đáp ứng auxin ở đậu tương và SL ở *Arabidopsis thaliana* trong quá trình đáp ứng lại điều kiện bất lợi, đặc biệt là tập trung vào điều kiện khô hạn. Các kết quả nghiên cứu của

chúng tôi tạo tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo trong vấn đề này. Đồng thời, cung cấp tài liệu tham khảo cho công tác giảng dạy và nghiên cứu thuộc lĩnh vực công nghệ sinh học thực vật và công nghệ sinh học nông nghiệp.

#### **4.2. Ý nghĩa thực tiễn**

- Nghiên cứu này cho phép chúng tôi xác định được một số gen tiềm năng nhằm phục vụ cho công tác chọn tạo giống đậu tương có khả năng chống chịu với điều kiện bất lợi (hạn, mặn) của môi trường bằng công nghệ gen.

- Kết quả nghiên cứu này cũng mở ra hướng nghiên cứu ứng dụng của SL trong việc giảm thiểu những ảnh hưởng tiêu cực của các yếu tố bất lợi của môi trường đến năng suất cây trồng.

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

- Cung cấp có hệ thống về đặc điểm và chức năng của các gen *GmARF* trong đáp ứng với điều kiện hạn ở cây đậu tương.

- Xác định được một số gen *GmARF* đặc hiệu mô, cơ quan có tiềm năng ứng dụng cho công nghệ gen để chọn tạo các giống đậu tương có khả năng chống chịu điều kiện hạn.

- Chứng minh được vai trò của SL trong quá trình chống chịu hạn và mặn ở cây mô hình *Arabidopsis thaliana*.

- Mở ra hướng nghiên cứu ứng dụng SL nhằm tăng cường khả năng chống chịu hạn, mặn của cây trồng trong sản xuất nông nghiệp.

#### **6. Cấu trúc của luận án**

Luận án được trình bày trong 107 trang, bao gồm 28 hình, 8 bảng. Luận án sử dụng 185 tài liệu tham khảo, trong đó có 9 tài liệu tham khảo tiếng Việt, 176 tài liệu tham khảo tiếng Anh và 8 trang web được sử dụng.

# CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU

## 1.1. Đặt vấn đề

Đậu tương là một trong những cây trồng có vai trò kinh tế hàng đầu trên thế giới, cung cấp nguồn dầu thực vật, protein, khoáng chất cho con người và thức ăn gia súc. Tuy nhiên, năng suất của đậu tương bị tác động rất lớn bởi các điều kiện bất lợi ngoại cảnh, đặc biệt là hạn hán. Thực vật nói chung và đậu tương nói riêng kích hoạt nhiều cơ chế nhằm thích nghi với điều kiện khô hạn. Trong vòng 20 năm trở lại đây, rất nhiều gen, trong đó có cả các gen chức năng và các gen điều hòa, được xác định ở nhiều loại cây trồng quan trọng như lúa (*Oryza sativa*) và đậu tương, tham gia vào các cơ chế chống chịu hạn. Tuy nhiên các thông tin cụ thể về thành phần và cơ chế điều hòa quá trình thích nghi ở thực vật còn chưa được sáng tỏ. Do đó, nghiên cứu về cơ chế chống chịu hạn hán ở đậu tương, điển hình là thông qua mô tả họ phiên mã đáp ứng auxin là một nghiên cứu thiết thực, góp phần phát triển các giống đậu tương chịu hạn.

Bên cạnh đó, yếu tố mặn cũng gây ảnh hưởng không nhỏ tới năng suất cây trồng. Để làm sáng tỏ sự đáp ứng của thực vật đối với điều kiện mặn và hạn, chúng tôi sử dụng cây mô hình *Arabidopsis* và đi sâu vào nghiên cứu về con đường tín hiệu của hormone thực vật SL. Bởi vì, *Arabidopsis* được chọn là cây mô hình bởi nhiều ưu điểm: vòng đời ngắn, có hệ gen nhỏ, đã biết đầy đủ trình tự, không tốn diện tích trồng nhưng lại tạo được nhiều hạt, tự thụ và có mối quan hệ gần gũi với các loài cây lương thực họ cải. SL đã được mô tả trong nhiều nghiên cứu với vai trò quan trọng trong điều hòa các quá trình sinh lý của thực vật. Tuy nhiên, vai trò của SL trong chống chịu với điều kiện hạn và mặn vẫn chưa được chỉ ra cụ thể. Vì vậy, việc tìm ra và nghiên cứu sâu rộng về vai trò của SL trong điều kiện hạn và mặn là rất cần thiết nhằm bổ sung thêm vào nguồn kiến thức sinh học, và xa hơn là ứng dụng trong nông nghiệp và cải tiến giống.

Tóm lại, để đánh giá các gen mục tiêu có thể ứng dụng cho kỹ thuật di truyền, trong nghiên cứu này, chúng tôi sẽ tập trung vào họ yếu tố phiên mã đáp ứng auxin ở đậu tương (GmARF) và SL trong đáp ứng với các yếu tố bất lợi phi sinh học ở thực vật.

## 1.2. Cơ chế đáp ứng của thực vật với các điều kiện bất lợi của môi trường

Khi gặp điều kiện môi trường bất lợi như khô hạn, mặn và lạnh, thực vật thường có những phản ứng sinh lý đa dạng, phức tạp để thích nghi và tồn tại (Manavalan *et al.*, 2009). Về cơ chế sinh lý, để thích nghi với điều kiện khô hạn, mặn và lạnh, thực vật sẽ đóng các khí khổng, giảm hô hấp và quang hợp, giảm thể tích nước trong các mô thực vật, quá trình sinh trưởng chậm lại, hệ rễ phát triển xuyên sâu và lan rộng để hút nước (Tran and Mochida, 2010). Về cơ chế phân tử, khả năng chống chịu của thực vật với các điều kiện bất lợi của môi trường, trong đó có tính trạng chịu hạn, thường là các tính trạng được kiểm soát bởi nhiều gen (Dorothea and Ramanjulu, 2005). Trong quá trình đáp ứng với các điều kiện bất

lợi, có sự tham gia của rất nhiều các yếu tố phiên mã và các nhân tố *cis-acting* của các promoter thuộc hệ thống điều hòa biểu hiện gen đóng vai trò như các phân tử khởi động biểu hiện gen cũng như các tín hiệu dẫn truyền kết thúc của các quá trình điều hòa, giúp cho cây đáp ứng tốt hơn với các nhân tố stress. Bên cạnh đó, phytohormone cũng có vai trò vô cùng quan trọng trong sự chống chịu và hình thành các cơ chế thích nghi.

### **1.3. Tổng quan về yếu tố phiên mã đáp ứng auxin ở thực vật**

#### **1.3.1. Khái niệm, phân loại yếu tố phiên mã**

##### **1.3.1.1. Khái niệm**

Yếu tố phiên mã là một protein gắn đặc hiệu với trình tự DNA trong vùng điều khiển, tham gia điều khiển quá trình phiên mã của gen (Latchman, 1997; Brivanlou and Darnell, 2002).

##### **1.3.1.2. Phân loại**

Các yếu tố phiên mã có thể được phân loại dựa vào cơ chế hoạt động, chức năng hoặc sự tương đồng trình tự trong cấu trúc vùng trình tự đặc trưng liên kết với DNA (DNA-binding domain, DBD) của chúng (Karin, 1990; Latchman, 1997; Brivanlou and Darnell, 2002). Dựa vào trình tự tương đồng của vùng đặc trưng DBD, các yếu tố phiên mã có chung vùng trình tự đặc trưng DBD được xếp chung vào một họ (nhóm) các yếu tố phiên mã.

#### **1.3.2. Cấu trúc và chức năng của yếu tố phiên mã**

##### **1.3.2.1. Cấu trúc**

Cấu trúc của yếu tố phiên mã bao gồm một số vùng trình tự đặc trưng: vùng trình tự liên kết với DNA (DBD), Vùng kích hoạt trans (trans-activating domain, TAD) và Vùng cảm biến tín hiệu (signal sensing domain, SSD).

##### **1.3.2.2. Chức năng**

Chức năng cơ bản đầu tiên của các yếu tố phiên mã đó là tham gia điều hòa sự phiên mã của gen (Weinzierl, 1999). Vai trò cơ bản tiếp theo của các yếu tố phiên mã đó là đảm bảo tính đặc hiệu của sự phiên mã. Các yếu tố phiên mã giữ vai trò trong điều hòa sự phát triển của tế bào cũng như cơ thể sinh vật (Lobe, 1992). Một trong những vai trò quan trọng của yếu tố phiên mã đó chính là tham gia vào sự đáp ứng với các yếu tố môi trường ngoại cảnh (Fujita *et al.*, 2005; He *et al.*, 2005; Hu *et al.*, 2006; Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006; Fang *et al.*, 2008; Nakashima *et al.*, 2009; Cutler *et al.*, 2010; Fujita *et al.*, 2011).

#### **1.3.3. Tình hình nghiên cứu của các yếu tố phiên mã trong chống chịu các điều kiện bất lợi của môi trường**

#### **1.3.4. Yếu tố phiên mã đáp ứng auxin**

##### **1.3.4.1. Khái niệm, đặc điểm cấu trúc**

Auxin là một loại phytohormone được biết đến với vai trò điều hòa sự sinh trưởng và phát triển của thực vật (Kieffer *et al.*, 2010; de Jong *et al.*, 2011; Lau *et al.*, 2011; Ha *et al.*, 2012). Các

nghiên cứu về di truyền và hóa sinh ở *Arabidopsis* đã chứng tỏ rằng, sự điều hòa phiên mã của các gen đáp ứng với auxin (auxin response gen) được điều khiển bởi hai họ yếu tố phiên mã lớn đó là nhân tố đáp ứng auxin (ARF) và auxin/indole acetic acid (Aux/IAA) (Guilfoyle and Hagen, 2007).

Ở *Arabidopsis*, có 23 ARF, trong đó hầu hết đều có chứa vùng trình tự liên kết DNA đầu N (N-terminal DNA-binding domain, DBD), một vùng ở giữa điều hòa quá trình phiên mã (transcriptional regulatory region, TRR hay middle region, MR) và một vùng trình tự lặp kép ở đầu C (carboxy-terminal dimerization domain, CTD) (Perez-Rodriguez *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2011). DBD của các ARF có chứa trình tự đặc biệt liên kết với trình tự đáp ứng với auxin (auxin response element, AuxRE, TGTCTC) trên vùng promoter của các gen đáp ứng với auxin ở giai đoạn đầu tiên và giai đoạn sớm. Cấu trúc của TRR của mỗi ARF thường hoạt động như một yếu tố hoạt hóa hoặc ức chế. Vùng hoạt hóa (activation domain, AD) của các ARF thường có chứa trình tự giàu glutamine (Q), serine (S) và leucine (L), trong khi vùng ức chế (repression domain, RD) chứa trình tự giàu S, L và proline (P); S, L hoặc glycine (G) hoặc S. Trình tự ARF CTD có chứa trình tự amino acid liên quan đến domain III và IV trong protein Aux/IAA, làm chức năng tạo ra sự lặp kép domain (dimerization domain) giữa các ARF CTD hoặc giữa các protein Aux/IAA (Guilfoyle and Hagen, 2007).

#### **1.3.4.2. Vai trò và tình hình nghiên cứu họ yếu tố phiên mã đáp ứng auxin**

Đặc điểm, cấu trúc, chức năng và hoạt động của các yếu tố phiên mã ARF cũng đã được nghiên cứu cơ bản và đầy đủ ở trên cây mô hình *Arabidopsis thaliana* (Guilfoyle and Hagen, 2007). Các đột biến trong các gen *AtARF01* và *AtARF02* dẫn đến kết quả làm chậm quá trình chết tự nhiên của lá và sự rụng hoa (Ellis *et al.*, 2005; Lim *et al.*, 2010). Trong khi đó, hai gen *AtARF07* và *AtARF19* được biết có vai trò điều hòa dương tính đối với sự phát triển của rễ phụ (Fukaki *et al.*, 2006). Với tầm quan trọng của các yếu tố phiên mã ARF trong sự đa dạng sinh học và các quá trình sinh lý cũng như tiềm năng ứng dụng trong sự phát triển và nâng cao khả năng chống chịu điều kiện bất lợi của các cây trồng chuyển gen, họ các yếu tố phiên mã ARF đã được xác định và phân tích trong rất nhiều loại cây trồng như ngô (*Zea mays*) (Xing *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012), lúa (*Oryza sativa*) (Jain, 2009; Song *et al.*, 2009; Shen *et al.*, 2010), kê (*Sorghum bicolor*) (Wang *et al.*, 2010a), cà chua (*Solanum lycopersicum*) (Wu *et al.*, 2011); cải bắp (*Brassica rapa*) (Mun *et al.*, 2012) và cam đường (*Citrus sinensis*) (Li *et al.*, 2015).

#### **1.3.5. Các yếu tố phiên mã ở đậu tương**

Ở đậu tương có 61 họ yếu tố phiên mã đã được phát hiện với tổng số 5035 yếu tố phiên mã. Tuy nhiên, trong số đó có 857 gen chưa được nghiên cứu về đặc điểm, chức năng cũng như vai trò của chúng. Có nhiều họ yếu tố phiên mã được xác định đóng vai trò điều khiển sự đáp ứng đối với các điều kiện bất lợi ở đậu tương như họ GmNAC (Le *et al.*, 2011), GmNFYA (Ni *et al.*, 2013), GmWRKY (Lou *et al.*, 2013).

## **1.4. Tổng quan về strigolactone**

### **1.4.1. Định nghĩa, phân loại strigolactone**

Strigolactone là một loại hormone thực vật, chúng là các terpenoid có nguồn gốc từ carotenoid. SL được mô tả lần đầu cách đây hơn 45 năm như một chất kích thích sự nảy mầm của các thực vật ký sinh như *Striga*, *Orobanche* và *Phelipanche* (Xie and Yoneyama, 2010; Ruyter-Spira *et al.*, 2013). SL cũng được chứng minh như một tín hiệu giúp tăng cường tương tác cộng sinh giữa thực vật và nấm cộng sinh với rễ thực vật (arbuscular mycorrhizal fungi, AMF), quá đó tăng cường khả năng phát sinh đa chồi của AMF (Akiyama *et al.*, 2005). Gần đây, SL còn được biết đến với vai trò quan trọng trong sự ức chế phát sinh chồi phụ ở nách lá (Gomez-Roldan *et al.*, 2008; Umehara *et al.*, 2008).

Các gen liên quan đến SL được phân thành 2 nhóm chính, bao gồm các gen sinh tổng hợp SL và các gen truyền dẫn tín hiệu SL.

### **1.4.2. Đặc điểm cấu trúc của strigolactone**

Cho tới ngày nay, hơn 19 loại SL tự nhiên được tìm thấy từ rất nhiều loài thực vật, và chúng có cấu trúc khung gồm 4 vòng (A, B, C and D), trong đó vòng A và B là chỗ bám của nhiều chất thay thế; vòng C và D là các lactone dị vòng liên kết bởi một liên kết enol-ether (Hình 1.5).(+)-5-Deoxystrigol được biết đến là tiền thân của các SL khác (Matusova *et al.*, 2005)

### **1.4.3. Quá trình sinh tổng hợp của strigolactone**

SL có tiền thân là phân tử carotenoid, trải qua các quá trình phân cắt khác nhau bởi các loại enzyme, sau đó liên kết với các thụ thể, truyền tín hiệu và biểu hiện thành tính trạng.

### **1.4.4. Quá trình vận chuyển và truyền dẫn tín hiệu strigolactone**

SL cũng giống như các loại phytohormone khác, chúng được vận chuyển trong cơ thể thực vật bởi một hệ thống tiếp nhận chuyên biệt. Hai thành phần truyền dẫn tín hiệu của SL là  $\alpha/\beta$ -fold hydrolase, D14(Arite *et al.*, 2007; Arite *et al.*, 2009; Hamiaux *et al.*, 2012; Waters *et al.*, 2012b) và F-box protein, MAX2/D3/RMS4 (Dun *et al.*, 2009a; Nelson *et al.*, 2011).

### **1.4.5. Vai trò của strigolactone**

SL được phát hiện lần đầu tiên thông qua vai trò kích thích sự nảy mầm của các loài thực vật ký sinh (Xie and Yoneyama, 2010; Ruyter-Spira *et al.*, 2013). Chức năng của SL trong quá trình sinh trưởng và phát triển của thực vật tiếp tục được nghiên cứu trong những năm gần đây. Chúng được biết đến với vai trò như một loại hormone thực vật (Gomez-Roldan *et al.*, 2008; Umehara *et al.*, 2008; Xie and Yoneyama, 2010). Với vai trò của một hormone, SL tham gia điều tiết sự phát triển của thân, giảm sự phát triển của nhánh (Gomez-Roldan *et al.*, 2008; Umehara *et al.*, 2008).

### **1.4.6. Tiềm năng ứng dụng của strigolactone**

SL là nhân tố quan trọng trong sự điều khiển quá trình sinh trưởng và phát triển của thực vật. SL và các chức năng sinh học đa dạng của chúng có thể trở thành một tiềm năng, công cụ để phát triển các phương thức và công nghệ mới trong lĩnh vực nông nghiệp theo con đường nông nghiệp bền vững.



# CHƯƠNG 2: VẬT LIỆU, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

## 2.1. Vật liệu, hóa chất, thiết bị nghiên cứu

### 2.1.1. Vật liệu thực vật

Giống đậu tương mô hình Williams 82 (W82) được sử dụng làm vật liệu thực vật nghiên cứu về họ yếu tố phiên mã đáp ứng auxin trong điều kiện hạn ở đậu tương.

Cây mô hình thực vật *Arabidopsis thaliana* sử dụng cho nghiên cứu vai trò của SL trong đáp ứng với điều kiện bất lợi phi sinh học (hạn, mặn) bao gồm các dòng đột biến *Arabidopsis thaliana max2-3* (SALK\_092836), *max2-4* (SALK\_028336), *max3-11* (SALK\_023975), *max3-12* (SALK\_015785), *max4-7* (SALK\_082552), và *max4-8* (SALK\_072750) được sử dụng trong nghiên cứu này có nguồn gốc di truyền từ *Arabidopsis thaliana* Columbia-0 (Col-0, cây nguyên thủy, wild-type, WT) và được mô tả trong nghiên cứu trước đây (Umehara et al., 2008).

### 2.1.2. Hóa chất

### 2.1.3. Thiết bị và phần mềm

## 2.2. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

### 2.2.1. Thời gian nghiên cứu

Các nội dung nghiên cứu được thực hiện từ 4/2012 đến 3/2015.

### 2.2.2. Địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện tại Nhóm nghiên cứu về Phương thức dẫn truyền tín hiệu, Trung tâm Khoa học về nguồn tài nguyên bền vững, RIKEN. 1-7-22 Suehiro, Tsurumi, Yokohama, Nhật Bản 230-0045; và Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ tế bào thực vật, Viện Di truyền nông nghiệp, đường Phạm Văn Đồng, Từ Liêm, Hà Nội.

## 2.3. Phương pháp nghiên cứu

### 2.3.1. Phương pháp trồng, xử lý và thu mẫu đậu tương và *Arabidopsis*

#### 2.3.1.1. Phương pháp trồng, xử lý và thu mẫu đậu tương

#### 2.3.1.2. Phương pháp trồng, xử lý và thu mẫu *Arabidopsis*

### 2.3.2. Phương pháp xác định các thành viên của GmARF và các gen liên quan đến sinh tổng hợp và truyền dẫn tín hiệu strigolactone ở đậu tương

Toàn bộ các yếu tố phiên mã ARF được dự đoán của đậu tương (GmARF) được thu thập trực tiếp từ các nguồn cơ sở dữ liệu về yếu tố phiên mã sẵn có (Mochida et al., 2009, 2010a; Wang et al., 2010b; Zhang et al., 2011) và chỉ các GmARF có chứa đầy đủ khung đọc mở (open reading frames, ORFs), được kiểm tra lại bởi Glyma v1.1 (<http://www.phytozome.net/soybean>) mới được sử dụng cho các phân tích tiếp sau. Các gen giống nhau 90% trở lên về trình tự nucleotide được xác định là các gen nhân đôi hay gen tương đồng (duplicated gen) (Cheung et al., 2003).

Các gen tương đồng liên quan đến sinh tổng hợp và truyền dẫn tín hiệu SL ở đậu tương được xác định dựa trên sự tương đồng về trình tự nucleotide với các gen *MAX* ở *Arabidopsis thaliana* thông qua phương pháp BLAST trên Glyma v1.1 (<http://www.phytozome.net/soybean>).

### **2.3.3. Phương pháp xây dựng và phân tích cây phát sinh chủng loại**

Sự liên kết trình tự của tất cả các ARF được xác định từ *Arabidopsis* và đậu tương được thể hiện thông qua phần mềm Clustal W và MEGA (Thompson et al., 1997; Tamura et al., 2007). Sự sắp xếp có thể được quan sát thông qua sử dụng phần mềm GeneDoc (<http://www.nrbsc.org/gfx/genedoc/>). Cây phát sinh chủng loại được xây dựng trên phương pháp neighbor-joining trên phần mềm MEGA 5. Mức độ tin cậy của các nhóm đơn ngành được ước tính bằng cách sử dụng phân tích bootstrap với 10.000 lần nhắc lại. Chỉ có giá trị bootstrap cao hơn 50% được hiển thị bên cạnh các giao điểm các nhánh.

### **2.3.4. Phương pháp phân tích mức độ biểu hiện của các gen *GmARF* sử dụng các dữ liệu microarray và Illumina transcriptome sẵn có của đậu tương.**

Đối với phân tích mức độ biểu hiện của các gen liên quan đến mô đặc hiệu của các gen *GmARF*, dữ liệu từ 68 loại mô và cơ quan khác nhau được lấy từ Genevestigator (<https://www.genevestigator.com/>) (Hruz et al., 2008). Dữ liệu trình tự Illumina transcriptome cung cấp bởi Libault et al. (Libault et al., 2010b; Libault et al., 2010a) được sử dụng cho phân tích mức độ biểu hiện của các gen *GmARF* trong 8 mô: nốt sần của cây 35 ngày tuổi (thu hoạch sau 32 ngày lây nhiễm của cây 3 ngày tuổi), ngọn của cây 14 ngày tuổi, hoa (giai đoạn R2), quả xanh (giai đoạn R6), lá và rễ cây 18 ngày tuổi (giai đoạn V2), đầu rễ và lông rễ của cây con 3 ngày tuổi.

Phân tích sự biểu hiện của các gen *GmARF* ở đậu tương tại giai đoạn V6 và R2 trong điều kiện hạn, cây đậu tương được sinh trưởng trong chậu và được xử lý hạn cho tới khi độ ẩm của đất giảm xuống còn dưới 5%, dữ liệu microarray công bố bởi Le et al. (Le et al., 2012a) được sử dụng trong nghiên cứu này.

### **2.3.5. Phương pháp tách chiết RNA và tổng hợp cDNA, thiết kế mồi cho phân tích sự biểu hiện gen ở đậu tương và *Arabidopsis***

#### **2.3.5.1. Tách chiết RNA, tổng hợp cDNA ở đậu tương**

#### **2.3.5.2. Tách chiết RNA, tổng hợp cDNA ở *Arabidopsis***

#### **2.5.3.3. Thiết kế mồi cho RT-qPCR**

### **2.3.6. Phương pháp xử lý hạn và phân tích microarray ở *Arabidopsis***

Các cây nguyên thủy Col-0 và *max2-3* (30 cây mỗi loại) được trồng trên môi trường GM (chứa muối Murashige-Skoog (MS), vitamin B5, sucrose 1%, agar 0.7%, pH 5.7) đến 14 ngày tuổi (22<sup>0</sup>C, chu kỳ 16 h sáng/8 h tối, cường độ chiếu sáng 60  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  photon flux), sau đó các cây được chuyển ra đất như mô tả trong thí nghiệm đánh giá kháng hạn và được tiếp tục trồng trong điều kiện có nước đầy đủ trong 10 ngày tiếp theo. Phần thân (phía trên mặt đất) của cây 24 ngày tuổi được cắt và tiến hành xử lý với hạn bằng cách đặt trên giấy Towel trên bàn thí nghiệm. Ở các thời điểm xử lý hạn, hàm

lượng nước tương đối (relative water content, RWC) của các mẫu được xác định (n=5). Các lá rosette của cây nguyên thủy và đột biến *max2-3* được xử lý hạn trong 0, 2, 4, 6 h và thu mẫu cho thí nghiệm microarray và RT-qPCR. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần độc lập. Phân tích microarray sử dụng *Arabidopsis* Oligo 44K DNA microarray (version 4.0; Agilent Technology) đã được mô tả trong các nghiên cứu trước đây (Nishiyama et al., 2012; Nishiyama et al., 2013). cDNA được tổng hợp từ 500 ng RNA tổng số và được tiến hành dán nhãn với Cy3 sử dụng Quick Amp Labeling Kit (Agilent Technologies), sau đó mẫu được lai với *Arabidopsis* Oligo 44K DNA microarray Kit (Ver. 4.0, Agilent Technologies). Toàn bộ các mẫu sau đó được scan trên máy microarray scanner G2505B (Agilent Technologies) và được tiến hành phân tích thông qua phần mềm GeneSpring. Số liệu microarray và quy trình chi tiết được đăng tải Gene Expression Omnibus database (accession no. GSE48949). MapMan (<http://mapman.gabipd.org>) và VirtualPlant (<http://virtualplant.bio.nyu.edu/cgi-bin/vpweb/>) được sử dụng cho phân tích số liệu. Trong một số trường hợp, mức độ biểu hiện của các gen đáp ứng với ABA và điều kiện bất lợi được phân tích từ dữ liệu sẵn có trên các cơ sở dữ liệu Genevestigator ([www.genevestigator.com](http://www.genevestigator.com)) hoặc The *Arabidopsis* eFP browser ([http://bar.utoronto.ca/efp\\_Arabidopsis/cgi-bin/efpWeb.cgi](http://bar.utoronto.ca/efp_Arabidopsis/cgi-bin/efpWeb.cgi)).

### **2.3.7. Các phương pháp đánh giá khả năng chịu hạn, chịu mặn và chịu áp suất thẩm thấu**

#### **2.3.7.1. Phương pháp đánh giá khả năng chịu hạn ở *Arabidopsis***

#### **2.3.7.2. Phương pháp đánh giá khả năng chịu mặn**

#### **2.3.7.3. Phương pháp kiểm tra sự nảy mầm trong môi trường muối ở *Arabidopsis***

#### **2.3.7.4. Phương pháp đánh giá sự sinh trưởng rễ ở *Arabidopsis* trong điều kiện mặn và áp suất thẩm thấu cao**

#### **2.3.7.5. Phương pháp kiểm tra sự đóng mở khí khổng, xác định mật độ khí khổng ở *Arabidopsis***

#### **2.3.7.6. Phương pháp đánh giá sự đáp ứng nhạy cảm với ABA ở *Arabidopsis***

### **2.3.8. Phương pháp RT-qPCR và phân tích thống kê các số liệu**

Phản ứng RT-qPCR và phân tích số liệu được thực hiện bằng các phương pháp được công bố trước đây (Le et al., 2011b). Gen *Ribosome RNA 60S* được sử dụng là gen tham chiếu (reference gen) (Le et al., 2012b) cho phân tích sự biểu hiện của các gen đích ở đậu tương và gen *Polyubiquitin 10 (UBQ10)* được sử dụng là gen tham chiếu cho phân tích sự biểu hiện của các gen đích ở *Arabidopsis* (Nishiyama et al., 2013) và phương pháp delta-CT được sử dụng để tính toán sự thay đổi biểu hiện của các gen đích. Phương pháp Student's *t*-test (one tail, unpaired, equal variance) được sử dụng để đánh giá mức độ tin cậy của sự sai khác thống kê giữa các mô, cơ quan và các mẫu xử lý khác nhau. Để xác định sự khác biệt của mức độ biểu hiện trong nghiên cứu này, chúng tôi lấy giá trị thay đổi trên 3 lần đối với sự biểu hiện đặc hiệu mô và 2 lần trở lên khi phân tích sự tăng hay giảm biểu hiện trong các điều kiện xử lý. Các mức độ biểu hiện được coi là đặc hiệu mô, tăng hoặc giảm sự biểu hiện chỉ được chấp nhận khi chúng đạt yêu cầu về sự sai khác có ý nghĩa thống kê thông qua phương pháp Student's *t*-test ( $P < 0.05$ ).

## CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

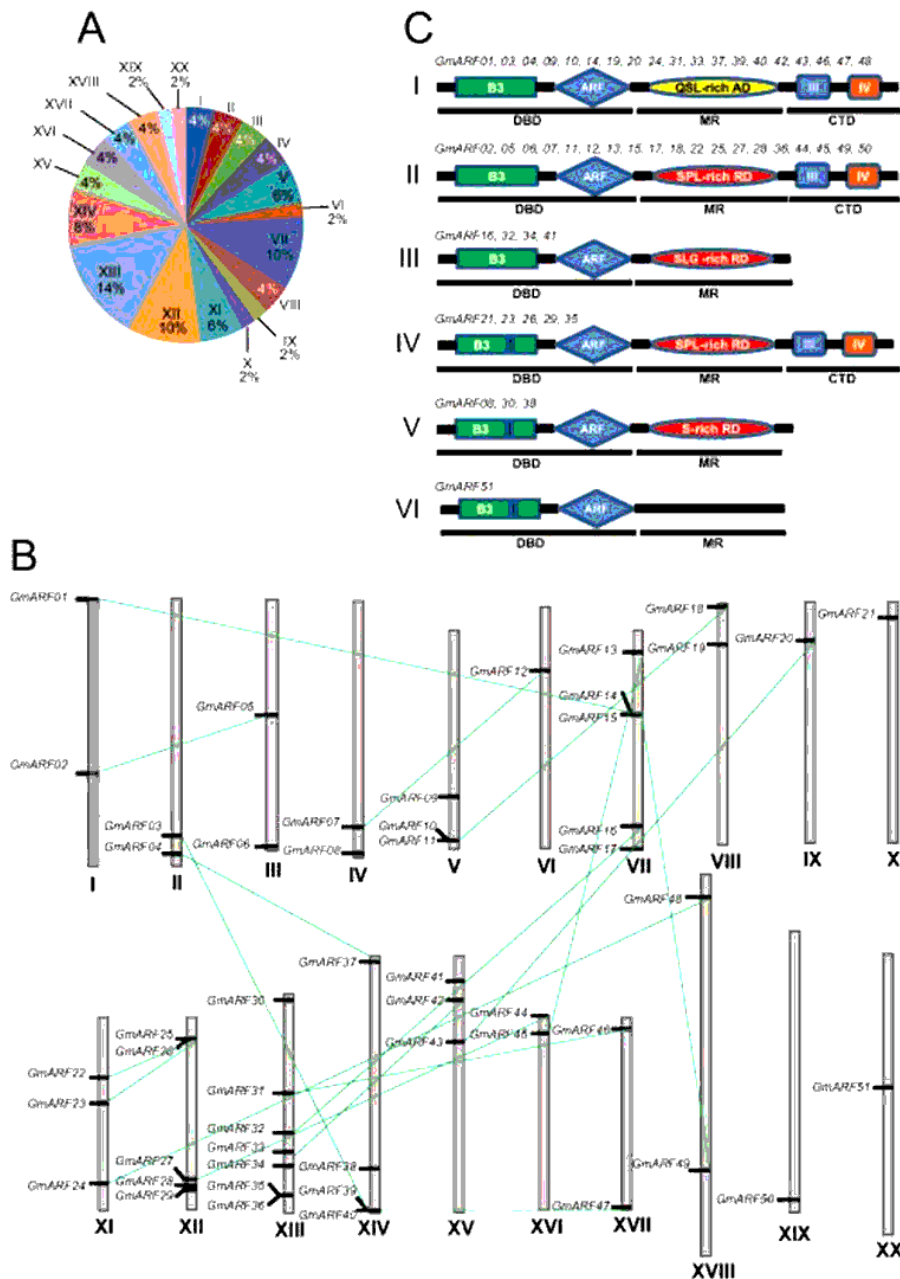
### 3.1. Vai trò của các yếu tố phiên mã đáp ứng auxin trong điều kiện hạn ở đậu tương

#### 3.1.1. Thành viên thuộc họ các yếu tố phiên mã đáp ứng auxin ở đậu tương

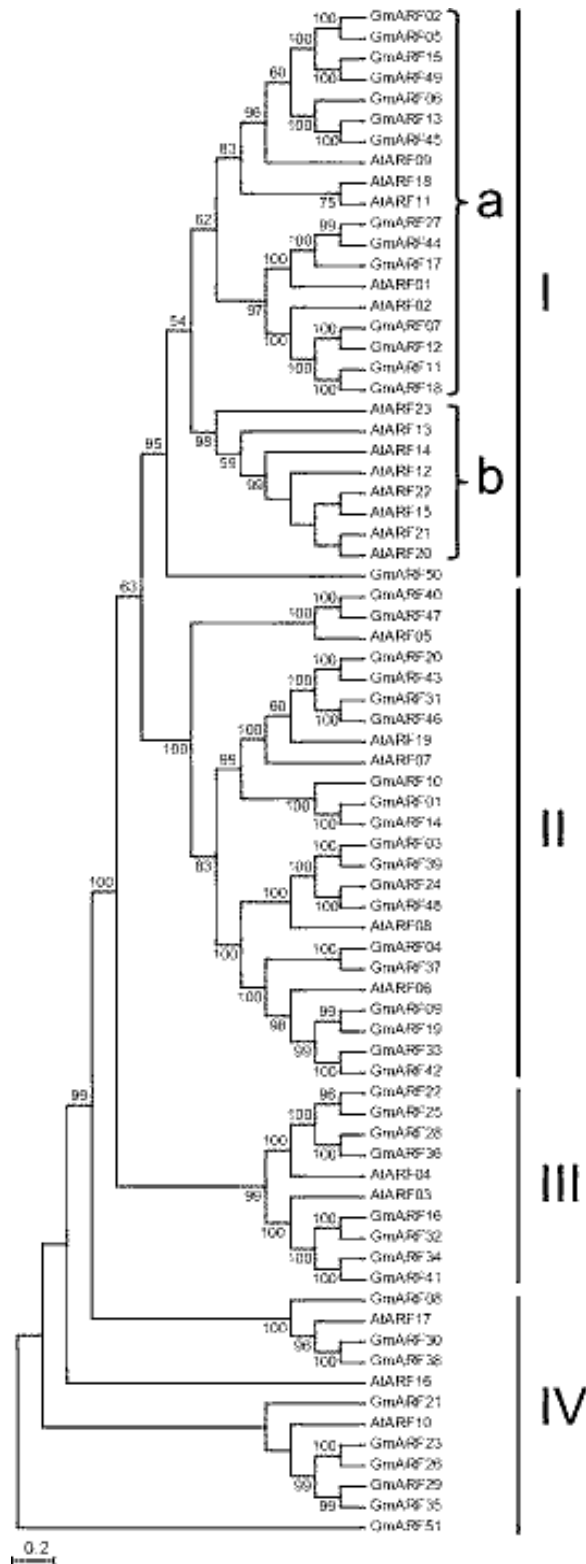
Gần đây, có 3 cơ sở dữ liệu, đó là SoybeanTFDB (Mochida, Yoshida et al. 2009), SoyDB (Wang, Libault et al. 2010) và PlantTFDB (Zhang, Jin et al. 2011) cung cấp thông tin về các TF của đậu tương. Chúng tôi xác định được 51 GmARF có trình tự đầy đủ khung đọc mở (open reading frame, ORF) được giữ lại để cho các nghiên cứu tiếp sau.

#### 3.1.2. Sự phân bố, cấu trúc và mối tương quan của các gen thuộc họ các yếu tố phiên mã đáp ứng auxin trong hệ gen của đậu tương

Trong số 51 *GmARFs* ở đậu tương, có 17 cặp gen được xác định là duplicates, trong đó mỗi cặp giống nhau  $\geq 90\%$  trình tự của nucleotide (Hình 3.1). Để dự đoán chức năng của các *GmARF* ở đậu tương, cây chủng loại phát sinh được thiết lập từ trình tự protein của các GmARF và AtARF từ đậu tương và *Arabidopsis*. Như kết quả được chỉ ra ở Hình 3.2.



Hình 3.1: Thành phần, phân bố các gen *GmARF* trên NST và cấu trúc của các protein *GmARF*. (A) Tỷ lệ phân bố (theo %) của các gen *GmARF* trên nhiễm sắc thể. (B) Vị trí tương đối của các gen *GmARF* trên nhiễm sắc thể. (C) Sơ đồ kết cấu của của các tâm phản ứng của protein *GmARF*. Trình tự của một ARF điển hình bao gồm một vùng trình tự đặc hiệu liên kết với DNA (DBD)), trong đó có chứa tiểu phần B3 và tiểu phần đáp ứng auxin (auxin-response, ARF), một vùng trình tự ở giữa (middle region (MR)) và một vùng trình tự phần đuôi (carboxy-terminal dimerization domain (CTD)).



Hình 3.2: Cây phân tích phát sinh chủng loại của các yếu tố phiên mã đáp ứng auxin ở đậu tương và Arabidopsis. Cây phân loại được thiết lập sử dụng trình tự của các protein ARF có đầy đủ khung đọc mở. Đơn vị khoảng cách thể hiện sự đa dạng tương đối giữa các trình tự được kiểm tra. Giá trị bootstrap (bootstrap value, là giá trị xác định độ tin cậy và tính chính xác của cho từng nhánh cây trong cây phân loại) cao hơn 50% được thể hiện ở phần bên cạnh của các nhánh.

### 3.1.3. Biểu hiện của các gen *GmARF* trong các mô và các cơ quan khác nhau ở điều kiện bình thường

Trong nội dung tiếp theo của nghiên cứu này, chúng tôi tập trung tìm hiểu về sự biểu hiện đặc hiệu ở các mô của các gen *GmARF* bởi vì nó có thể giúp chúng tôi nhận ra được các gen tham gia vào phát triển chuyên hóa của các mô riêng biệt. Hơn thế nữa, sự nhận biết các gen đặc hiệu mô, ví dụ như các gen đặc hiệu ở rễ, cung cấp một nguồn promoter đặc hiệu rễ cho sự phát triển khả năng chống chịu hạn bằng cách tăng cường sự sinh trưởng và phát triển của bộ rễ (Werner, Nehnevajova et al. 2010; Ha, Vankova et al. 2012). Kết quả nghiên cứu mức độ biểu hiện của các gen *GmARF* ở điều kiện bình thường ở thân và rễ cây đậu tương con thể hiện tại hình 3.3

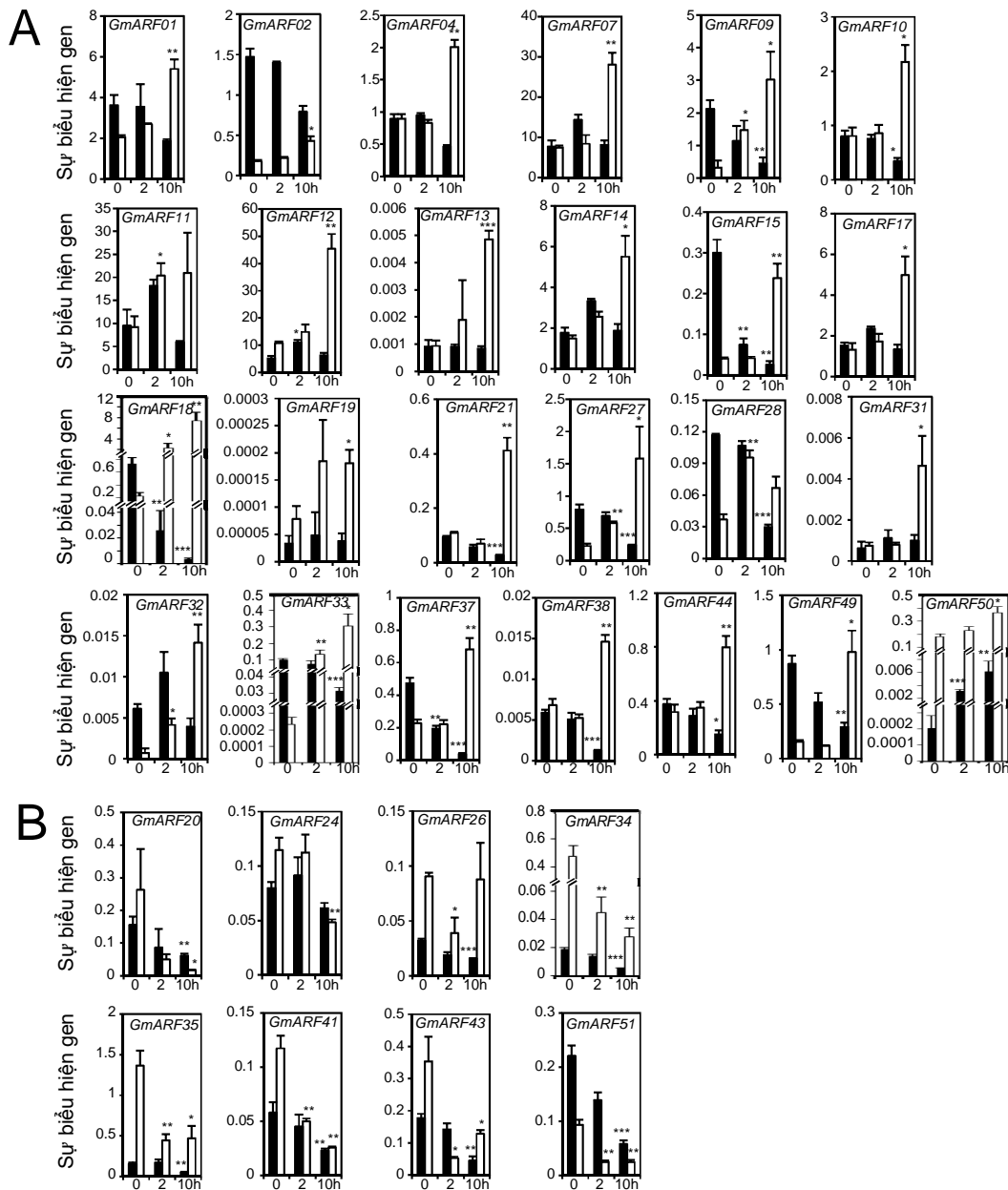


Hình 3.3: Sự biểu hiện của 51 gen *GmARF* ở rễ và thân của cây đậu tương 12 ngày tuổi trong điều kiện bình thường. Dựa trên mức độ biểu hiện của các gen, các *GmARF* được chia làm 6 nhóm (A-F). Kết quả thể hiện giá trị trung bình và sai số chuẩn được tính từ 3 mẫu độc lập. Ký hiệu ngôi sao thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê được sử dụng qua phương Student's *t*-test (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ). Sự biểu hiện tương đối (relative expression) của gen được tính dựa trên mức độ biểu hiện của gen so sánh với gen tham chiếu 60s.

Kết quả cho thấy rằng, 18 gen được xác định là sự biểu hiện đặc hiệu trong các mô, cơ quan riêng biệt, trong đó có 7 gen đặc hiệu ở thân (*GmARF*25, 29, 34, 35, 36, 48, 50), 11 gen đặc hiệu ở rễ (*GmARF*02, 05, 09, 15, 18, 22, 27, 28, 32, 33, 49).

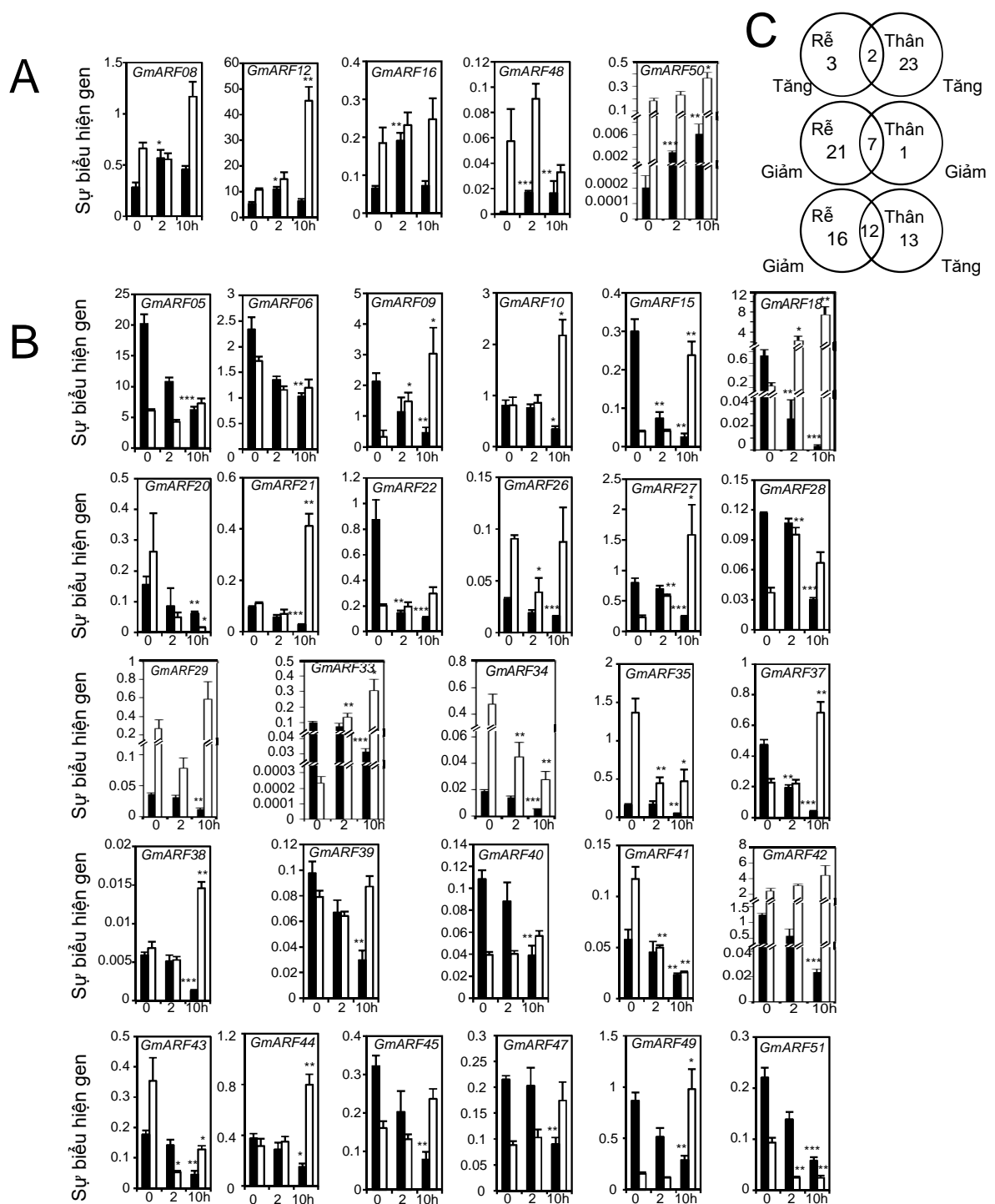
### 3.1.4. Biểu hiện của các gen *GmARF* ở rễ và thân của cây trong điều kiện hạn

Kết quả phân tích mức độ biểu hiện của 51 gen *GmARF* trong điều kiện hạn thông qua phương pháp RT-qPCR. Việc phân tích sự biểu hiện của các gen trong các mô riêng biệt cung cấp các thông tin hữu ích hơn về sự hoạt động của các gen *GmARF* liên quan đến điều kiện bất lợi trong các loại mô cụ thể.



Hình 3.6. Kết quả phân tích RT-qPCR của các gen *GmARF* ở rễ (cột màu đen) và thân (cột màu trắng) của cây đậu tương trong điều kiện khô hạn. (A) Các gen *GmARF* tăng cường sự biểu hiện ở thân ít nhất 2 lần. (B) Các gen *GmARF* giảm sự biểu hiện ở thân ít nhất 2 lần. Giá trị thể hiện giá trị trung bình và sai số chuẩn được tính từ 3 mẫu độc lập. Ký hiệu ngôi sao thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê được tính theo phương pháp Student's *t*-test (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ). Sự biểu hiện tương đối được tính trên mức độ biểu hiện của gen đích so sánh với gen tham chiếu 60s.





Hình 3.7. Kết quả phân tích RT-qPCR của các gen *GmARF* ở rễ (cột màu đen) và thân (cột màu trắng) của cây đậu tương trong điều kiện khô hạn. (A) Các gen *GmARF* tăng cường sự biểu hiện ở rễ ít nhất 2 lần. (B) Các gen *GmARF* giảm sự biểu hiện ở rễ ít nhất 2 lần. Giá trị thể hiện giá trị trung bình và sai số chuẩn được tính từ 3 mẫu độc lập. (C) Hình phân tích của các gen *GmARF* ở thân và rễ của cây đậu tương 12 ngày tuổi. Ký hiệu ngôi sao thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê được tính theo phương pháp Student's t-test (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ). Sự biểu hiện tương đối được tính trên mức độ biểu hiện của gen đích so sánh với gen tham chiếu 60s.

Từ các kết quả phân tích qRT-PCR của các gen *GmARF* trong điều kiện hạn (Hình 3.6 và 3.7) cho thấy, có nhiều gen là gen được tăng cường bởi điều kiện bất lợi. Trong đó, 2 gen (*GmARF12*, *50*) tăng và 7 gen (*GmARF20*, *26*, *34*, *35*, *41*, *43*, *51*) giảm mức độ biểu hiện ở cả rễ và thân. Trong số 30 gen *GmARF* giảm sự biểu hiện ở rễ, có 12 gen (*GmARF09*, *10*, *15*, *18*, *21*, *27*, *28*, *33*, *37*, *38*, *44*, *49*) tăng cường sự biểu hiện ở thân. Hai gen *GmARF33* và *GmARF50* có mức độ biểu hiện cao nhất, là các gen tiềm năng ứng dụng cho công tác chọn tạo giống đậu tương chống chịu hạn bằng công nghệ gen.

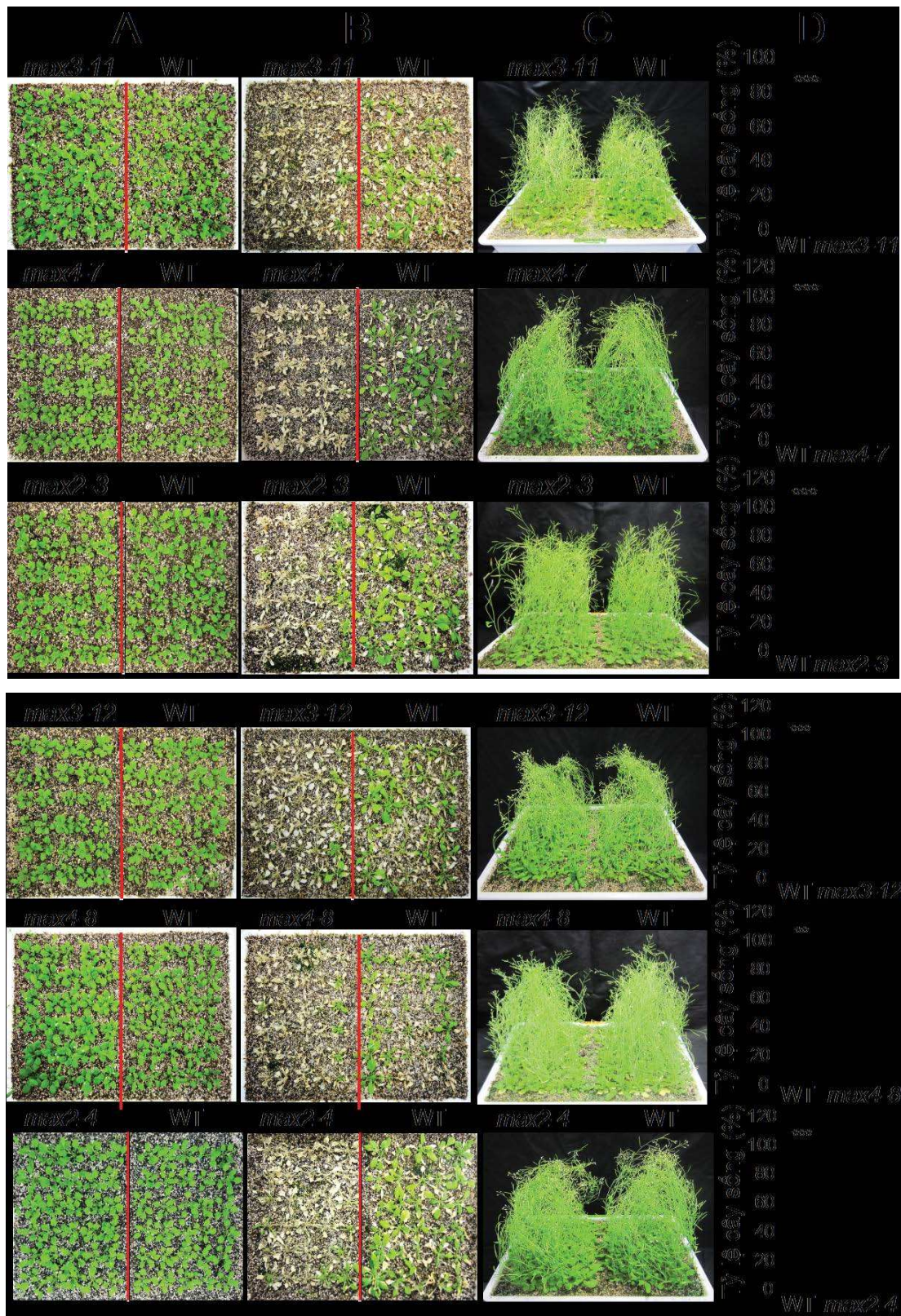
### **3.1.5. Biểu hiện của các gen *GmARF* ở điều kiện hạn trong giai đoạn cây con và cây trưởng thành của cây đậu tương**

Như trình bày ở nội dung trước, hạn làm thay đổi sự biểu hiện của rất nhiều gen *GmARFs* trong cả rễ và thân của cây đậu tương 12 ngày tuổi. Gần đây, sử dụng 66 K Affymetrix Soybean Array GenChip, chúng tôi thực hiện nghiên cứu tổng thể sự phiên mã của toàn bộ các gen ở đậu tương ở giai đoạn V6 và R2 trong điều kiện hạn hán (Le, Nishiyama et al. 2012). Các kết quả cho thấy, các gen *GmARF* biểu hiện phổ biến mã đa dạng ở trong các giai đoạn sinh trưởng khác nhau của cây đậu tương.

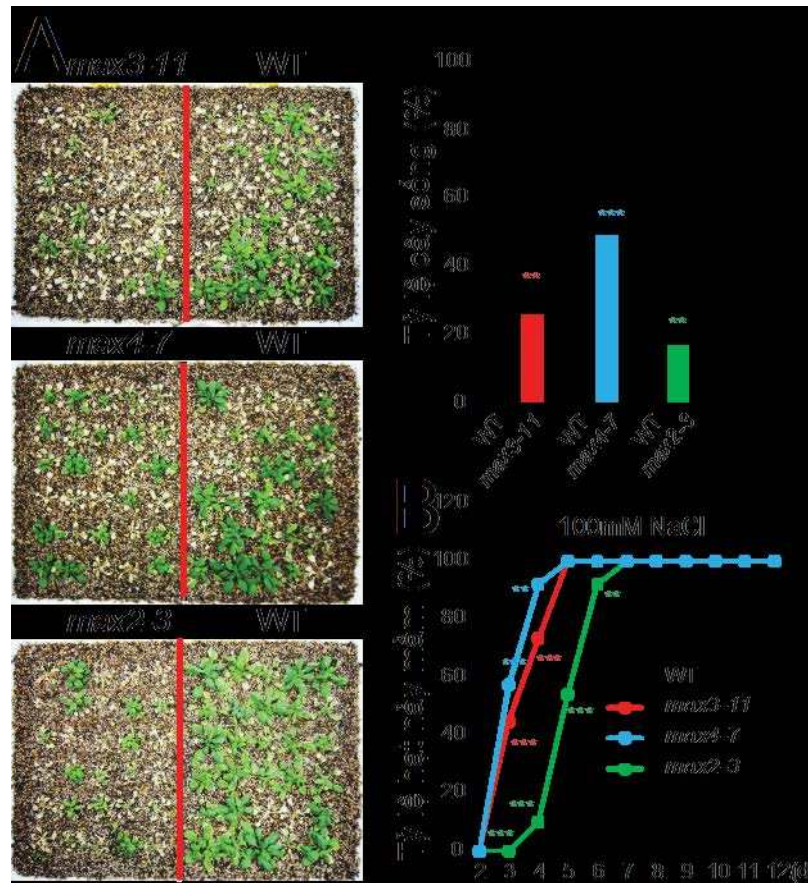
## **3.2. Vai trò của strigolactone trong điều kiện hạn, mặn ở *Arabidopsis***

### **3.2.1. Khả năng chịu hạn và mặn của các cây đột biến gen *max***

Nhằm xác định vai trò của SL trong chịu hạn và mặn ở *Arabidopsis*, các cây *Arabidopsis* đột biến gen *max* và cây nguyên thủy được đánh giá phản ứng trong điều kiện hạn và nồng độ muối cao. Các kết quả đánh giá khả năng chịu hạn và mặn được tóm tắt trong hình 3.9 và hình 3.10. Từ các kết quả cho thấy, các cây đột biến gen *max* thể hiện sự nhạy cảm cao với điều kiện hạn và mặn. Qua đó cũng cho thấy rằng, SL đóng vai trò quan trọng trong sự đáp ứng của thực vật với các điều kiện bất lợi.

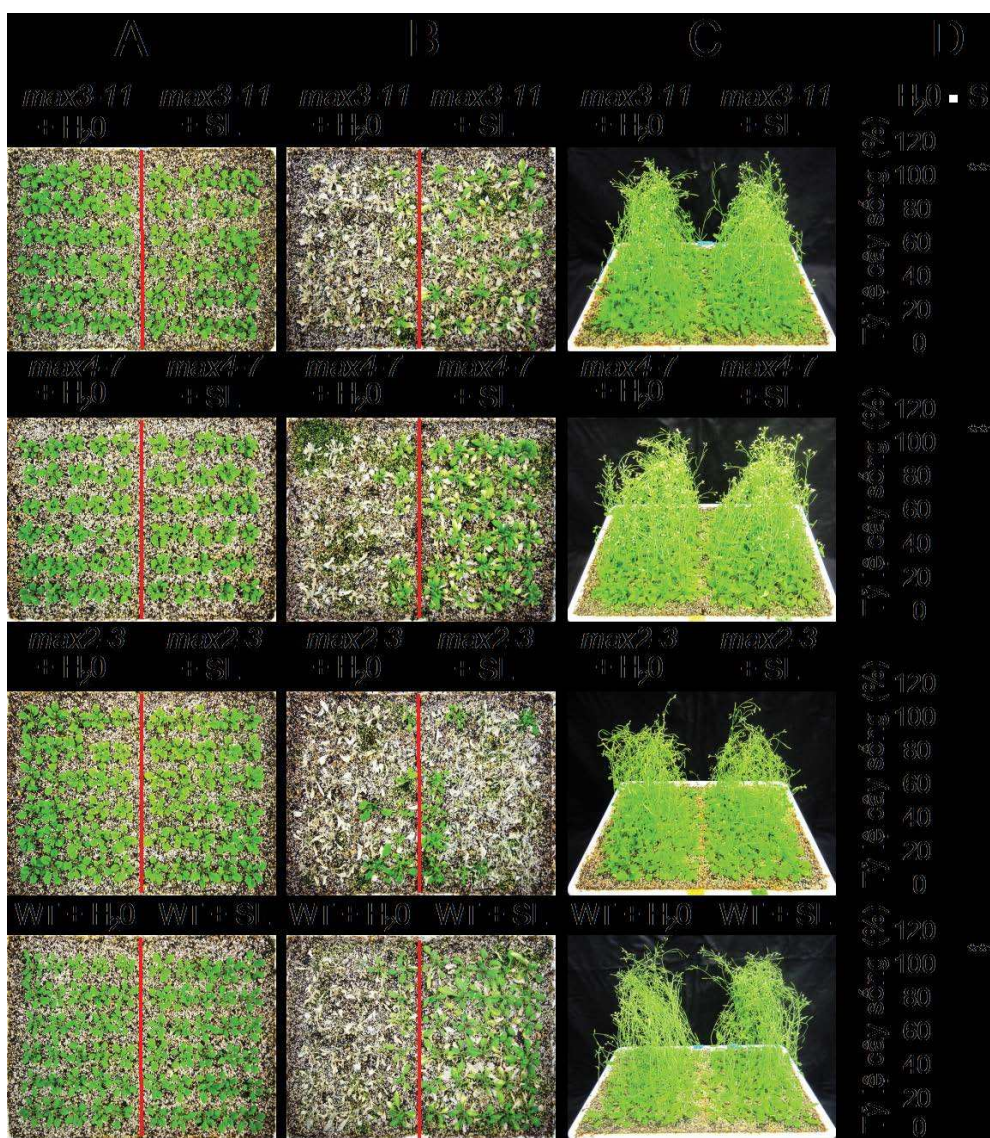


Hình 3.9: Đánh giá khả năng chịu hạn của các cây đột biến gen max. (A) Cây 2 tuần tuổi được chuyển từ môi trường GM sang đất và được trồng thêm 1 tuần. (B) Cây 3 tuần tuổi được tiến hành xử lý hạn và tưới nước trở lại. Các khay được chụp hình sau 3 ngày tưới nước trở lại. (C) Cây nguyên thủy và max ở điều kiện bình thường (đối chứng). (D) Tỷ lệ các cây sống và sai số chuẩn của cây nguyên thủy và max được tính từ 3 thí nghiệm độc lập ( $n = 30$  cây/kiểu gen). Ký hiệu ngôi sao thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê, được tính theo phương pháp Student's t-test (\*\*\*)  $P < 0.001$ , (\*\*) $P < 0.01$ ).



Hình 3.10: Đánh giá khả năng chống chịu mặn của các cây đột biến max. (A) Cây 2 tuần tuổi được chuyển từ môi trường GM sang đất và được trồng thêm 1 tuần. Cây 3 tuần tuổi được tiến hành xử lý với điều kiện mặn với 2L NaCl 200mM trong 6 ngày. Từ ngày thứ 7 đến ngày thứ 10 được bổ sung nước. Các khay được chụp hình sau 3 ngày tưới nước trở lại. Tỷ lệ các cây sống và sai số chuẩn của cây nguyên thủy và max được tính từ 3 thí nghiệm độc lập ( $n = 30$  cây/kiểu gen). (B) Thí nghiệm đánh giá sự nảy mầm của các cây max bị ức chế bởi nồng độ muối cao. Hạt của các cây nguyên thủy và cây đột biến được cho nảy mầm trên môi trường GM-sucrose 1% chứa NaCl 100 mM. Tỷ lệ nảy mầm được xác định bằng số hạt có lá mầm mở hoàn toàn. Sai số chuẩn được tính từ kết quả của 3 thí nghiệm độc lập với 50 hạt mỗi loại/thí nghiệm. Sau 2 ngày, toàn bộ các cây nguyên thủy và đột biến nảy mầm 100% ở GM-sucrose 1% không chứa NaCl. Ký hiệu ngôi sao thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê, được tính theo phương pháp Student's t-test (\*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ).

### 3.2.2. Vai trò của strigolactone ngoại sinh trong việc phục hồi khả năng kháng hạn ở cây đột biến gen *max3* và *max4* và tăng cường khả năng chịu hạn ở cây nguyên thủy

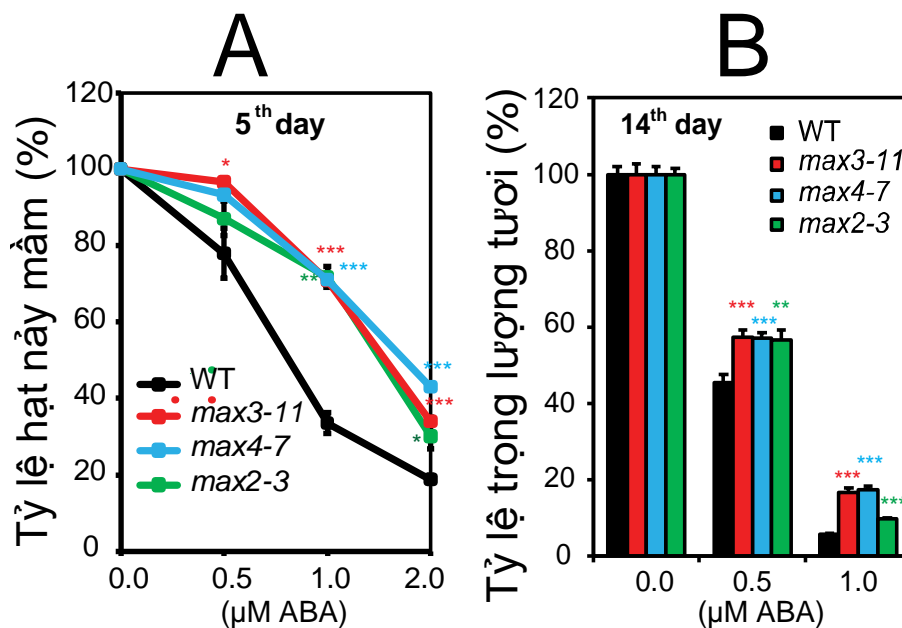


Hình 3.11: Ảnh hưởng của SL ngoại sinh đến kiểu hình và khả năng chịu hạn. (A) Cây 2 tuần tuổi được chuyển từ môi trường GM sang đất và được trồng thêm 1 tuần. (B) Cây 3 tuần tuổi được tiến hành xử lý hạn có bổ sung với SL hoặc dung môi đối chứng và tưới nước trở lại. Các khay được chụp hình sau 3 ngày tưới nước trở lại. (C) Cây nguyên thủy (WT) và *max* ở điều kiện bình thường (đối chứng). (D) Tỷ lệ các cây sống và sai số chuẩn của cây nguyên thủy và *max* được tính từ 3 thí nghiệm độc lập ( $n = 30$  cây/kiểu gen). Ký hiệu ngôi sao thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê, được tính theo phương pháp Student's *t*-test (\*\*\*)  $P < 0.001$

Để khẳng định kết luận vai trò điều hòa dương của SL trong đáp ứng với điều kiện hạn ở cây *Arabidopsis*, chúng tôi tiến hành ứng dụng SL ngoại sinh kết hợp với quá trình gây hạn nhân tạo. Kết quả được thể hiện qua hình 3.11 cho thấy, SL tăng cường khả năng chịu hạn ở cây nguyên thủy; đồng thời SL phục hồi khả năng chịu hạn ở các cây đột biến tổng hợp SL khi so sánh với đối chứng. Các kết quả này khẳng định chắc chắn hơn về vai trò điều hòa dương tính của SL trong đáp ứng với điều kiện stress hạn.

### 3.2.3. Phân tích tác động của ABA ngoại sinh tới các cây đột biến *max*

ABA là một loại phytohormone rất quan trọng của thực vật. Nó được coi là chất giữ vai trò quyết định nhất của thực vật trong quá trình đáp ứng lại các điều kiện bất lợi phi sinh học (Yamaguchi-Shinozaki and Shinozaki, 2006; Tran et al., 2007a; Fujita et al., 2011; Osakabe et al., 2014b; Osakabe et al., 2014a). Nhằm xác định sự tham gia của ABA trong các cây đột biến SL trong điều kiện bất lợi, chúng tôi đã tiến hành phân tích đáp ứng của các cây đột biến gen *max* ở các nồng độ ABA ngoại sinh khác nhau trong giai đoạn nảy mầm và sau nảy mầm. Kết quả được thể hiện tóm tắt qua hình 3.12 cho thấy, các cây đột biến thể hiện sự kém nhạy cảm với ABA ngoại sinh so với cây nguyên thủy. Qua đó cũng cho thấy có sự tương tác giữa SL và con đường tín hiệu ABA trong sự điều khiển đáp ứng với điều kiện bất lợi ở thực vật.



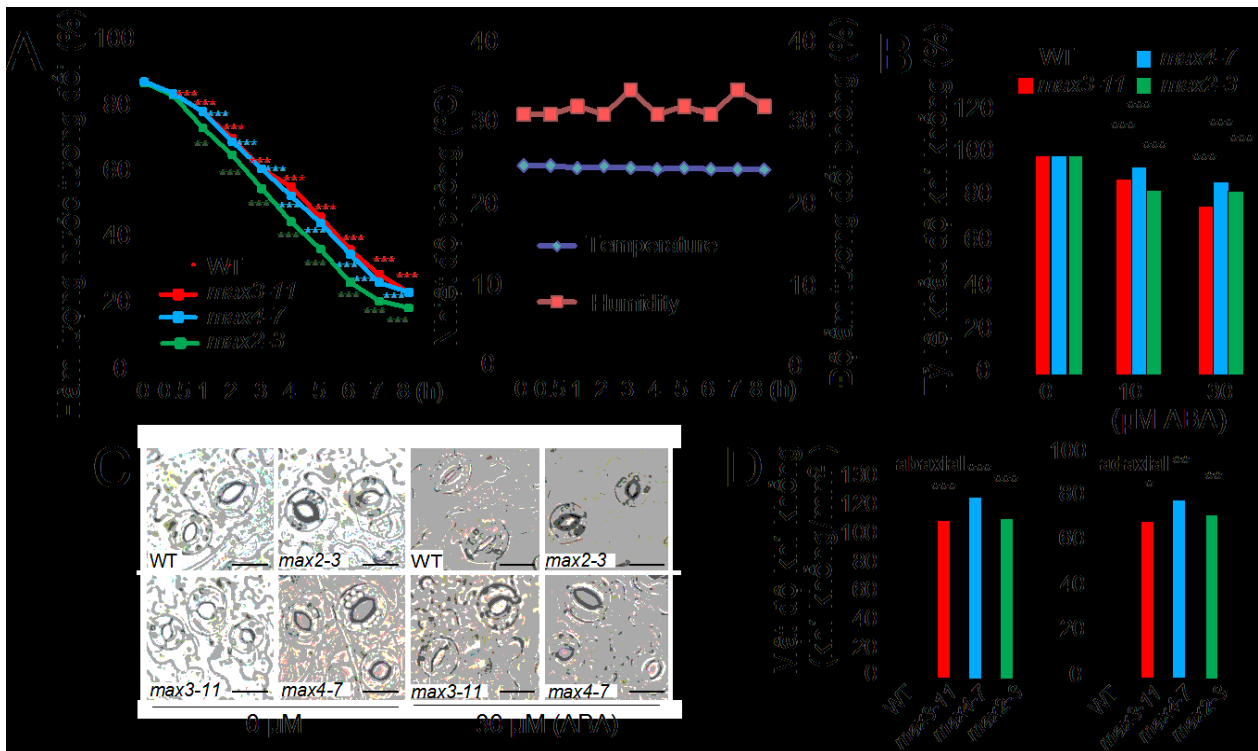
Hình 3.12: Đáp ứng của các cây đột biến gen *max* khi xử lý với ABA ngoại sinh tại thời điểm 5 ngày và 14 ngày. (A) Đáp ứng của các cây đột biến gen *max* với ABA ngoại sinh thông qua phương pháp đánh giá sự nảy mầm. Tỷ lệ nảy mầm được xác định sau 5 ngày ở điều kiện 22°C bằng phương pháp đếm số lượng hạt có lá mầm mở ra hoàn toàn. Sai số chuẩn được tính từ kết quả của 3 thí nghiệm độc lập với 50 hạt mỗi kiểu gen/thí nghiệm. (B) Đáp ứng của các cây *max* với ABA ngoại sinh thông qua phương pháp đánh giá sự ức chế sinh trưởng. Trọng lượng tươi của các cây nguyên thủy và cây đột biến gen *max* được xác định sau 14 ngày ở 22°C. Sai số chuẩn tính từ 6 lần cân độc lập ( $n=6$ , mỗi lần cân 7 cây). Ký hiệu ngôi sao biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê được xác định bằng phương pháp Student's *t*-test (\* $P<0.05$ ; \*\* $P<0.01$ ; \*\*\* $P<0.001$ ).

### 3.2.4. Sinh trưởng rễ của các cây đột biến *max* trong điều kiện nồng độ muối và áp suất thẩm thấu cao

Một trong những đặc điểm quan trọng của thực vật thích ứng với điều kiện áp suất thẩm thấu cao đó là sự thay đổi các đặc điểm của rễ, đặc biệt là sự sinh trưởng của rễ. Nhằm tìm hiểu sâu

hơn các cơ chế chứng tỏ các cây đột biến *max* chống chịu kém với các điều kiện bất lợi phi sinh học, chúng tôi tiến hành kiểm tra sự phát triển của rễ các cây *max* và WT trong điều kiện muối và áp suất thẩm thấu cao. Kết quả cho thấy, sự sinh trưởng của rễ của các cây *max* và WT là không khác biệt trong các điều kiện nồng độ NaCl và manitol khác nhau (Hình 3.14). Điều này chứng tỏ rằng kiểu hình chống chịu kém với điều kiện bất lợi của các cây *max* không phụ thuộc vào ảnh hưởng của sự sinh trưởng và phát triển của rễ, ít nhất là ở điều ở cây 11 ngày tuổi.

### 3.2.5. Ảnh hưởng của hạn và sự hoạt động của khí khổng dưới tác dụng của ABA ở cây đột biến gen *max*



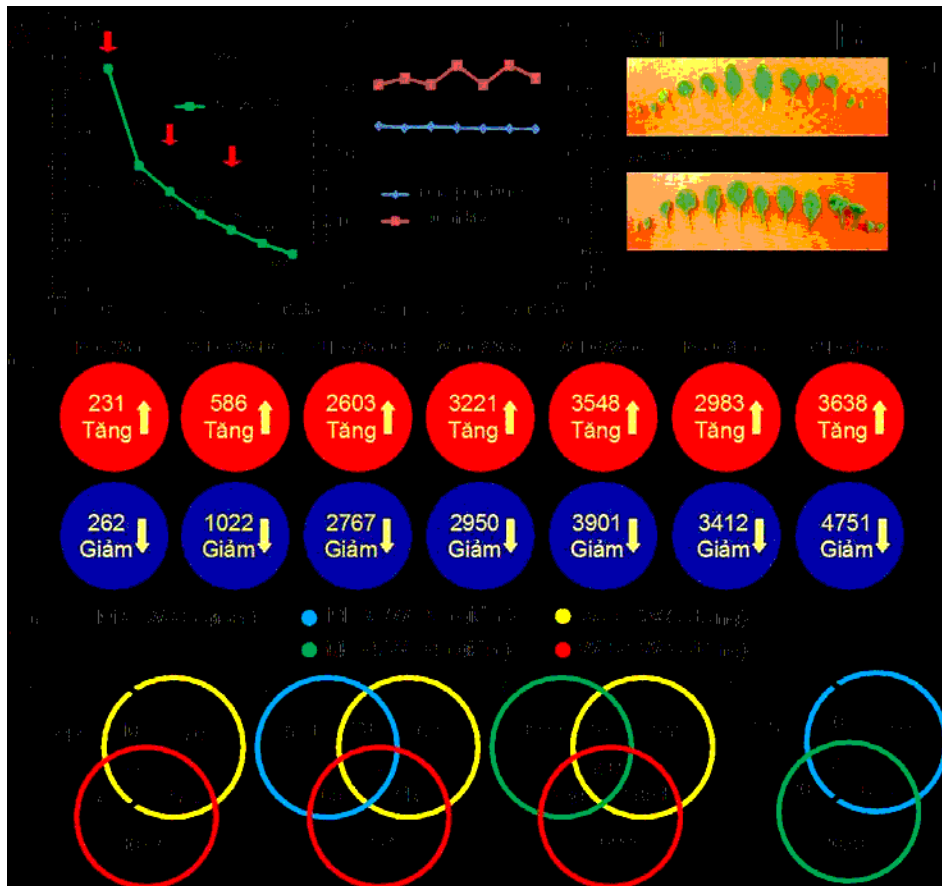
Hình 3.15: So sánh hàm lượng nước tương đối (relative water content), sự đóng mở của khí khổng (stomatal aperture) và mật độ khí khổng (stomatal density) của các nguyên thủy và cây đột biến gen *max*. (A) Hàm lượng nước tương đối theo thời gian xử lý hạn của các cây nguyên thủy và cây đột biến gen *max3-11*, *max4-7* và *max2-3*. Dữ liệu thể hiện giá trị trung bình và sai số chuẩn ( $n=5$ , mỗi lần cân 6 cây). Nhiệt độ và độ ẩm tương đối của phòng được ghi lại trong thời gian xử lý. (B) Kích thước trung bình của khí khổng của lá của cây 3 tuần tuổi trong trường hợp có và không có xử lý với ABA biểu thị tương đối qua giá trị phần trăm, kích thước khí khổng ở điều kiện không có ABA được xác định = 100%. Lốp biểu bì được xử lý với ABA trong 1h sau khi được tiến hành xử lý ở điều kiện chiếu sáng. Kết quả thể hiện giá trị trung bình và sai số ( $n = 200$ ). (C) Tế bào bảo vệ của cây nguyên thủy và cây đột biến gen *max* 3 tuần tuổi được xử lý với ABA 30 μM trong 1h hoặc điều kiện bình thường (control). Bar = 20 μm. (D) Mật độ khí khổng trung bình của hai mặt lá của lá cây nguyên thủy và cây đột biến gen *max* 3 tuần tuổi. Kết quả thể hiện giá trị trung bình và sai số ( $n = 30$ ). Ký hiệu ngôi sao biểu thị sự sai khác thống kê được xác định bằng phương pháp Student's *t*-test (\* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.005$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ).

Từ kết quả đánh giá phát triển của rễ ở nội dung 3.2.4 cho thấy, đặc điểm của thân cây đóng vai trò quan trọng trong sự biểu hiện kiểu hình chịu hạn kém của các cây đột biến gen *max*. Chúng tôi tiến hành kiểm tra hàm lượng nước và sự mất nước của lá của các cây đột biến gen *max* và nguyên thủy trong điều kiện xử lý hạn trên giá thể nhân tạo. Kết quả thể hiện tóm tắt trong hình 3.15 cho thấy, các cây đột biến *max* mất nước nhanh hơn trong điều kiện gây hạn. Lá của các cây đột biến có mật độ khí khổng cao hơn và sự đóng khí khổng chậm hơn dưới tác động của ABA ngoại sinh khi so sánh với cây nguyên thủy.

### **3.2.6. Kết quả phân tích microarray ở lá của các cây đột biến *genmax2-3* ở điều kiện bình thường và điều kiện hạn**

So sánh kết quả phân tích microarray ở lá của các cây nguyên thủy và cây đột biến gen *max2-3* ở điều kiện bình thường và điều kiện xử lý hạn được tiến hành sử dụng bộ kit *Arabidopsis* 44K DNA oligo microarrays (Hình 3.16). Kết quả là đã xác định được các gen tham gia trong các con đường sinh tổng hợp cuối (downstream pathways) chịu ảnh hưởng thông qua việc SL đáp ứng với điều kiện hạn. Kết quả phân tích microarray cũng cho thấy, có sự tương tác giữa SL, ABA và CK trong sự đáp ứng với điều kiện hạn. Đồng thời, SL cũng điều khiển sự đáp ứng với điều kiện hạn độc lập với ABA thông qua các quá trình sinh tổng hợp các hợp chất thứ sinh như flavonoid cũng như điều hòa sự quang hợp.





Hình 3.16: Phân tích sự biểu hiện khác nhau của lá các cây nguyên thủy và cây đột biến gen *max2-3* trong điều kiện bình thường và điều kiện hạn. (A) Cây nguyên thủy và cây *max2-3* 14 ngày tuổi được chuyển ra đất và trồng trong điều kiện bình thường trong 10 ngày tiếp theo. Phần thân của cây được cắt và xử lý hạn trên giấy Kim Towel. Tại các thời điểm, hàm lượng nước tương đối (relative water content) được xác định. Sai số là sai số chuẩn ( $n=5$ ). Các mẫu lá được thu ở các thời điểm 2 h và 4 h sau khi xử lý hạn được sử dụng cho phân tích microarray. Ký hiệu ngôi sao biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê được xác định bằng phương pháp Student's *t*-test (\*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ). Nhiệt độ và độ ẩm tương đối của phòng được ghi lại trong quá trình xử lý hạn. (B) Lá của cây nguyên thủy Col-0 và cây *max2-3*. (C) Biểu đồ các gen thay đổi sự biểu hiện trong các phân tích so sánh. Dữ liệu được lấy từ kết quả của 3 mẫu khác nhau. (D) Biểu đồ phân tích các gen giống và khác nhau ở các so sánh. M-C, *max2-3* ở điều kiện bình thường 0 h; M-D2, *max2-3* ở điều kiện hạn 2 h; M-D4, *max2-3* ở điều kiện hạn 4 h; W-C, Col-0 ở điều kiện bình thường, 0 h; W-D2, Col-0 ở điều kiện hạn 2 h; W-D4, Col-0 ở điều kiện hạn 4 h

### 3.2.7. Strigolactone ngoại sinh tăng cường khả năng chịu mặn ở đậu tương

Để phục vụ cho mục tiêu nghiên cứu chọn tạo giống đậu tương chống chịu các điều kiện bất lợi, chúng tôi tiến hành xác định các gen tham gia vào quá trình sinh tổng hợp và truyền dẫn tín hiệu SL, đồng thời phân tích và đánh giá vai trò của SL trong sự đáp ứng với điều kiện mặn. Các cây đậu tương được xử lý kết hợp giữa SL và NaCl thể hiện tính chịu mặn ưu việt trong điều kiện thí nghiệm. Kết quả này cũng tương đồng với kết quả đánh giá khả năng chịu mặn ở các dòng đột biến *Arabidopsis*. Kết quả cho thấy tiềm năng ứng dụng SL trong chọn tạo giống đậu tương chịu mặn bằng công nghệ gen.

# KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

## Kết luận

1. Xác định được 51 gen GmARF ở đậu tương, trong đó có 17 cặp gen tương đồng (gen chị em). Các yếu tố phiên mã GmARF được phân loại thành 6 nhóm dựa vào các đặc điểm trong cấu trúc phân tử protein suy diễn

2. 18 gen được xác định là sự biểu hiện đặc hiệu trong các mô, cơ quan riêng biệt, trong đó có 7 gen đặc hiệu ở thân (*GmARF25, 29, 34, 35, 36, 48, 50*), 11 gen đặc hiệu ở rễ (*GmARF02, 05, 09, 15, 18, 22, 27, 28, 32, 33, 49*).

3. Đã phân tích sự biểu hiện của gen trong điều kiện hạn và cho thấy có nhiều gen là gen đáp ứng với điều kiện bất lợi, 2 gen (*GmARF12, 50*) tăng và 7 gen (*GmARF20, 26, 34, 35, 41, 43, 51*) giảm mức độ biểu hiện ở cả rễ và thân. Trong số 30 gen *GmARF* giảm sự biểu hiện ở rễ, có 12 gen (*GmARF09, 10, 15, 18, 21, 27, 28, 33, 37, 38, 44, 49*) tăng cường sự biểu hiện ở thân. Trong đó, hai gen *GmARF33* và *GmARF50* có tiềm năng ứng dụng cho công tác chọn tạo giống đậu tương chống chịu hạn bằng công nghệ gen.

4. Xác định được vai trò điều hòa dương tính của SL trong đáp ứng với điều kiện hạn và mặn. Trong đó, các đặc điểm của phân thân đóng vai trò quan trọng hơn phần rễ.

5. Xác định được các gen liên quan đến SL đáp ứng với điều kiện khô hạn. Từ kết quả nghiên cứu cũng cho thấy rằng SL đáp ứng với điều kiện hạn và mặn thông qua cả hai con đường, con đường phụ thuộc vào ABA và con đường độc lập với ABA.

## Kiến nghị

1. Tiếp tục tiến hành nghiên cứu sâu hơn với các gen *GmARF* (*GmARF33* và *GmARF50*) đặc hiệu mô và đáp ứng với điều kiện bất lợi, từ đó có thể ứng dụng chúng trong chọn tạo giống đậu tương chịu hạn bằng công nghệ gen.

2. Tiến hành nghiên cứu ứng dụng SL trong việc giảm thiểu tác động tiêu cực của các yếu tố bất lợi phi sinh học đối với năng suất cây trồng.

## CÁC CÔNG TRÌNH ĐÃ CÔNG BỐ CÓ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. **Chien Van Ha**, Marco A. Leyva-Gonzalez, Yuriko Osakabe, Uyen Thi Tran, Rie Nishiyama, Yasuko Watanabe, Maho Tanaka, Motoaki Seki, Shinjiro Yamaguchi, Nguyen Van Dong, Kazuko Yamaguchi-Shinozaki, Kazuo Shinozaki, Luis Herrera-Estrella, Lam-Son Phan Tran (2014), “Positive regulatory role of strigolactone in plant responses to drought and salt stress”, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(2): 851-856.
2. **Chien Van Ha**, Dung Tien Le, Rie Nishiyama, Yasuko Wantanabe, Saad Sulieman, Uyen Thi Tran, Keiichi Mochida, Nguyen Van Dong, Kazuo Yamaguchi-Shinozaki, Kazuo Shinozaki, Lam-Son Phan Tran (2013), “The ARF transcription factor family in soybean: genome-wide identification and expression analyses during development and water stress”, *DNA Research*, 20(5): 511-524.