

TẠO DÒNG LẠC CHỊU HẠN BẰNG CÔNG NGHỆ TẾ BÀO THỰC VẬT**Vũ Thị Thu Thủy*, Nguyễn Thị Tâm, Chu Hoàng Mậu**

Trường Đại học Sư phạm, Đại học Thái Nguyên, *vuthuysptn@yahoo.com

TÓM TẮT: Xử lý mô sẹo của giống lạc L18 bằng thổi khô và bằng kết hợp chiếu xạ với thổi khô ở ngưỡng chọn lọc thổi khô 9 giờ kết hợp với chiếu xạ tia gamma 2 krad kết quả đã tạo được 198 dòng cây. Đánh giá khả năng chịu hạn của các dòng chọn lọc ở thế hệ thứ năm đã tuyển chọn được 3 dòng lạc RM48, R46 và RM47 có khả năng chịu hạn cao, trong đó dòng lạc RM48 có nguồn gốc từ mô sẹo chịu mất nước và chịu chiếu xạ có khả năng chịu hạn tốt nhất. Trình tự gen cystatin của dòng lạc chọn lọc RM48 có 19 vị trí nucleotide sai khác so với giống L18 (giống gốc-chịu hạn kém) và có 23 vị trí nucleotide sai khác so với giống lạc L23 (chịu hạn tốt); Trình tự amino acid của cystatin ở dòng RM48 khác với giống L23 ở 6 vị trí amino acid và khác với giống L18 ở 7 vị trí amino acid. Kết hợp đánh giá khả năng chịu hạn và so sánh trình tự gen cystatin đã chọn được dòng lạc RM48 có khả năng chịu hạn tốt so với giống gốc. Dòng lạc RM48 chịu hạn tốt có nguồn gốc từ mô sẹo chịu mất nước được xử lý kết hợp thổi khô 9 giờ với chiếu xạ tia gamma 2 krad có thể giới thiệu tham gia khảo nghiệm để tạo giống lạc chịu hạn.

Từ khóa: Chịu mất nước, chịu chiếu xạ, chịu hạn, gen cystatin, lạc, mô sẹo.

MỞ ĐẦU

Lạc (*Arachis hypogaea* L.) là cây công nghiệp, cây thực phẩm có giá trị được nhiều quốc gia trên thế giới ưu tiên phát triển sản xuất. Cây lạc thuộc nhóm cây đậu đỗ có khả năng chịu hạn kém. Sự thiếu nước trong các giai đoạn sinh trưởng phát triển của cây lạc sẽ làm ảnh hưởng đến năng suất, chất lượng lạc khi thu hoạch. Công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật là kỹ thuật hiệu quả cho phép ứng dụng và cải tiến nhiều đặc tính của cây trồng. Nếu kết hợp với tác nhân gây đột biến thì tần số phát sinh đột biến sẽ tăng lên đáng kể. Kết quả nghiên cứu ứng dụng công nghệ nuôi cấy mô tế bào thực vật để cải thiện khả năng chịu hạn ở cây lúa mì của Abdelsamad et al. (2007) [1] hay sự ra đời của hai giống lúa DR1, DR2 có khả năng chịu hạn ở Việt Nam [3]... là những công trình minh chứng cho tiềm năng của công nghệ tế bào thực vật. Giống lạc L18 được đánh giá có khả năng chịu hạn kém, nhưng lại có có năng suất cao [9]. Vì vậy, chúng tôi đặt mục tiêu cải thiện khả năng chịu hạn của giống lạc L18 bằng công nghệ tế bào thực vật.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Hai giống lạc L18, L23 do Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển đậu đỗ, Viện Cây lương thực và thực phẩm thuộc Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam cung cấp. Giống lạc

L18 chịu hạn kém được sử dụng trong thí nghiệm tạo dòng lạc chịu hạn bằng kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào, đối chứng là giống lạc L23 có khả năng chịu hạn tốt.

Tạo mô sẹo từ phôi trực của hạt lạc trên môi trường MS cơ bản có bổ sung 2,4-D ở nồng độ 12 mg/l. Mô sẹo nuôi ở buồng tối liên tục trong 10 ngày. Tiến hành gây mất nước mô sẹo bằng luồng khí vô trùng của box cấy và xử lý mô sẹo bằng chiếu xạ tia gamma tại Trung tâm Chiếu xạ Hà Nội, sau đó kết hợp gây mất nước bằng xử lý thổi khô. Các khối mô sau khi xử lý được tái sinh trên môi trường MS cơ bản có bổ sung BAP nồng độ 2 mg/l. Cây hoàn chỉnh được tạo ra trên môi trường MS có NAA nồng độ 0,5 mg/l. Phương pháp nuôi cấy *in vitro* theo mô tả của Nguyễn Thị Tâm và nnk. (2006) [7] có cải tiến.

Đánh giá khả năng chịu hạn của các dòng chọn lọc thông qua đánh giá các chỉ tiêu nông sinh học vào thời kỳ chín của cây theo chỉ dẫn của Bộ nông nghiệp và phát triển nông thôn; đánh giá khả năng chịu hạn ở giai đoạn hạt nảy mầm, giai đoạn cây non thông qua phân tích hoạt độ α - amylase, hàm lượng đường khử, tỷ lệ cây héo, cây phục hồi và chỉ số chịu hạn tương đối ở các ngày hạn khác nhau theo mô tả của Lê Trần Bình và Lê Thị Muội (1999) [3].

Gen cystatin được phân lập bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi được thiết kế dựa vào trình tự

có mã số AY722693 trên GenBank theo chu trình nhiệt 94°C/3'; 94°C/30s; 56°C/1'; 72°C/1'; 72°C/10', bảo quản ở 4°C. Sản phẩm PCR được dòng hóa vào *E. coli*, chủng DH5 α . Xác định trình tự của gen trên máy tự động ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer, tại Viện Công nghệ Sinh học. So sánh sự sai khác về trình tự gen cystatin bằng phần mềm BioEdit.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả tạo dòng mô sẹo chịu mất nước, tái sinh cây

Chúng tôi đã tiến hành tạo mô sẹo từ phôi trực của hạt lạc nhằm tạo dòng mô sẹo có khả năng chịu mất nước. Theo nghiên cứu, các tế bào có khả năng chịu mất nước trong điều kiện cực đoan là những tế bào có khả năng chống chịu tốt, cây tái sinh từ các dòng tế bào này sẽ là nguồn vật liệu có giá trị trong chọn dòng [3]. Mô sẹo lạc sau khi hình thành có kích thước, khối lượng rất khác nhau, vì vậy, mô sẹo cắt thành các khối đều nhau và phơi khô gây mất nước để xác định ngưỡng chịu đựng của các tế bào mô. Mô sẹo giống lạc L18, sau khoảng 6 giờ đến 9 giờ phơi khô, mô mất từ 84,71% đến 85,81% nước so với trọng lượng tươi. Tỷ lệ mô sống sót sau 4 tuần phục hồi đạt từ 40,74% đến 10,81%; tỷ lệ tái sinh đạt 68,47% đến 83,33% (sau 6 tuần phục hồi) và tế bào mô sẹo giống lạc L18 có ngưỡng chịu đựng phơi khô 9 giờ. Nhằm tăng tần số xuất hiện biến dị soma mà vẫn đảm bảo tỷ lệ mô sống sót và tái sinh cây cao chúng tôi đã thăm dò tác động của chiếu xạ kết hợp với phơi khô 9 giờ ở các liều chiếu xạ 0,5 krad- 1,0 krad- 2,0 krad- 3,0 krad- 4,0 krad. Hiệu quả tác động của các liều chiếu xạ cũng được xác định thông qua tỷ lệ mô sống sót, tỷ lệ mô sống sót tái sinh thành cây, kết quả đã xác định được liều lượng 2 krad kết hợp với phơi khô 9 giờ là phù hợp để lựa chọn sàng lọc dòng mô và tạo cây hoàn chỉnh.

Xử lý mô sẹo trong hệ thống nuôi cấy *in vitro* của giống lạc L18 bằng thí nghiệm phơi khô liên tục 9 giờ và thí nghiệm chiếu xạ ở liều lượng 2 krad kết hợp phơi khô liên tục 9 giờ, kết quả đã thu được 167 dòng mô và 198 dòng cây.

Đánh giá khả năng chịu hạn của các dòng lạc chọn lọc

Nghiên cứu một số chỉ tiêu của các dòng lạc được tạo ra bằng công nghệ tế bào ở các quần thể lạc chịu phơi khô liên tục 9 giờ (kí hiệu R₀) và chiếu xạ ở liều lượng 2 krad kết hợp phơi khô liên tục 9 giờ (kí hiệu RM₀), nhận thấy các dòng lạc chuyển từ ống nghiệm ra trồng ngoài đồng ruộng có sự biến động di truyền lớn hơn nhiều so với giống gốc. Từ kết quả đánh giá ở thể hệ R₀, RM₀, chúng tôi đã chọn được 7 dòng có nguồn gốc từ giống lạc L18, trong đó 3 dòng có nguồn gốc từ mô sẹo chịu ảnh hưởng của phơi khô là R44, R46, R48 và 4 dòng có nguồn gốc từ mô sẹo chịu ảnh hưởng của chiếu xạ kết hợp với phơi khô là RM46, RM47, RM48, RM49 làm vật liệu khởi đầu để đánh giá, chọn lọc ở các thể hệ tiếp theo. Kết quả đánh giá thực hiện đồng thời với giống gốc L18 (chịu hạn kém) và giống lạc L23 (chịu hạn tốt).

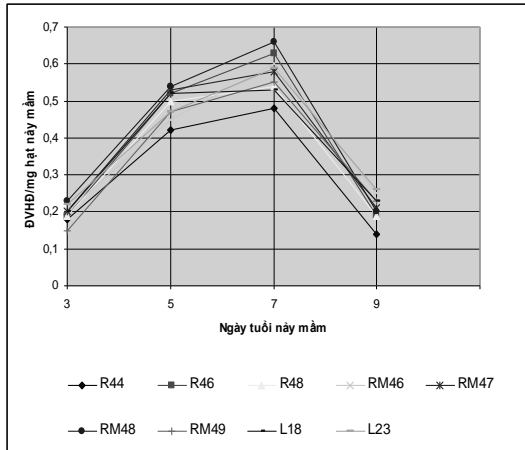
So với các cây trồng khác, hạt lạc rất khó bảo quản và tỷ lệ nảy mầm thấp khi thời gian bảo quản kéo dài. Số quả trên cây lạc ở những thể hệ đầu không đủ lớn để thực hiện các nghiên cứu liên quan đến khả năng chịu hạn. Vì vậy, toàn bộ hạt của 7 dòng lạc chọn lọc ở quần thể R₀, RM₀ chúng tôi trồng kế tiếp vào các vụ trồng trong năm. Cây của hạt R₀, RM₀ được gọi là thể hệ R₁, RM₁. Tương tự, cây của hạt R₁, RM₁ được gọi là thể hệ R₂, RM₂.

Tiến hành đánh giá khả năng chịu hạn của 7 dòng lạc chọn lọc thể hệ thứ năm (R44, R46, R48, RM46, RM47, RM48, RM49) cùng với hai giống lạc L18, L23 ở giai đoạn hạt nảy mầm bằng kỹ thuật gây hạn sinh lý, xử lý hạt bởi sorbitol 7%, sau đó xác định khả năng chịu hạn thông qua hoạt độ của α -amylase và hàm lượng đường. Kết quả cho thấy, hoạt độ của α -amylase và hàm lượng đường trong hạt nảy mầm có xu hướng tăng từ 3 ngày tuổi đến 7 ngày tuổi sau đó giảm dần ở giai đoạn 9 ngày tuổi (hình 1 và 2). Ở 5 và 7 ngày tuổi dòng RM48 có hàm lượng đường, hoạt độ của α -amylase cao nhất, còn dòng R44 thấp nhất.

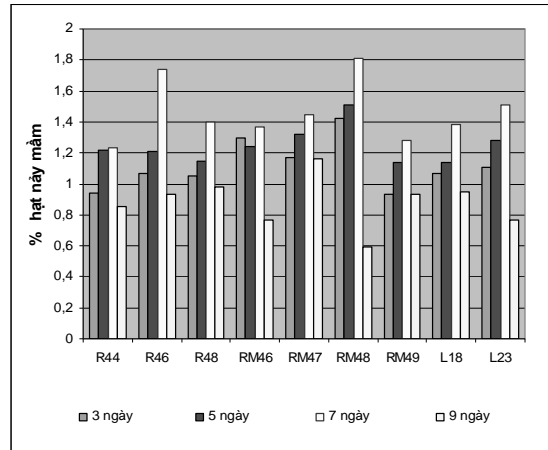
Theo quan điểm hiện nay, việc tích lũy các chất hòa tan trong tế bào đồng nhất với khái niệm điều chỉnh áp suất thẩm thấu. Đây là phương thức thích nghi của cơ thể thực vật đối với các yếu tố bất lợi của môi trường. Khi tế bào mất nước, các chất hòa tan sẽ được tích lũy dần để

chống lại sự mất nước đồng thời tăng khả năng giữ nước của chất nguyên sinh. Quá trình thủy phân polysaccharid dự trữ là nguồn cung cấp

chất tan cho quá trình điều chỉnh áp suất thẩm thấu của tế bào khi bị mất nước đồng thời góp phần thúc đẩy quá trình phục hồi cây [2].



Hình 1. Sự biến động về hoạt độ của α -amylase trong điều kiện hạn sinh lý



Hình 2. Sự biến động của hàm lượng đường trong điều kiện hạn sinh lý

Như vậy, hoạt độ của α -amylase cao cho biết khả năng phân giải tinh bột thành đường xảy ra mạnh mẽ, đảm bảo cung cấp năng lượng và chất dinh dưỡng cho quá trình nảy mầm của hạt, và điều chỉnh áp suất thẩm thấu của tế bào trong điều kiện mất nước cực đoan. Sự sai khác về hoạt độ của α -amylase và đường của các dòng, giống lạc ở các thời điểm hạt nảy mầm khác nhau liên quan đến khả năng chịu hạn của chúng. Các dòng chọn lọc có hoạt độ của α -amylase và hàm lượng đường cao hơn giống gốc đã minh chứng cho hiệu quả cải thiện khả năng chịu hạn của cây bằng kỹ thuật nuôi cấy mô tế bào thực vật.

động của chiếu xạ kết hợp với thổi khô (RM46; RM47; RM48), trong đó dòng RM48 có khả năng chịu hạn cao nhất.

Đánh giá khả năng chịu hạn ở giai đoạn cây non của các dòng chọn lọc ở thế hệ thứ năm trên cơ sở phân tích tỷ lệ cây không héo, cây phục hồi ở các thời điểm 1 đến 5 ngày gây hạn và xác định chỉ số chịu hạn tương đối (bảng 1).

Bảng 1. Chỉ số chịu hạn tương đối của các dòng lạc chọn lọc

Dòng/giống	Chỉ số chịu hạn tương đối
L18	4725,09
R44	4327,07
R46	7662,38
R48	5713,17
RM46	5019,50
RM47	5272,80
RM48	10089,20
RM49	3672,48
L23	7898,30

Bảng 1 cho thấy, dòng RM48 có chỉ số chịu hạn cao nhất (10089,20), sau đó đến dòng R46 và giống lạc L23, thấp nhất là các dòng R44, RM49 và giống gốc L18. Trong 7 dòng lạc chọn lọc có 5 dòng chọn lọc có chỉ số chịu hạn cao, 2 dòng có nguồn gốc từ mô sẹo chịu thổi khô (R46; R48) và 3 dòng có nguồn gốc từ mô sẹo chịu tác

So sánh trình tự gen cystatin phân lập từ dòng RM48, giống gốc L18 và giống L23

Cystatin là protein ức chế hoạt động của cystein proteinase. Cystatin gồm nhiều họ và cystatin của thực vật được xếp vào họ thứ tư bởi bên cạnh cấu trúc chung của nhóm, cystatin thực vật có thêm một trình tự amino acid bảo thủ ở vùng xoắn α ở đầu N: - [LVI]- [AGT]- [RKE]- [FY] - [AS]- [VI]-, trong đó các vị trí

trong dấu [] có thể thay thế cho nhau [4]. Nghiên cứu mối liên quan của cystatin với đặc tính chịu hạn của cây, Bray (1993) [2] đã đề cập sản phẩm của các gen tham gia duy trì chức năng tế bào trong suốt giai đoạn mất nước, đó là nhóm chất ức chế hoạt động của protease (protease inhibitor). Khi gen này hoạt động, sản phẩm tạo thành sẽ tham gia vào bảo vệ các enzyme, hạn chế sự phân giải các chất, do đó bảo vệ các cấu trúc trong tế bào.

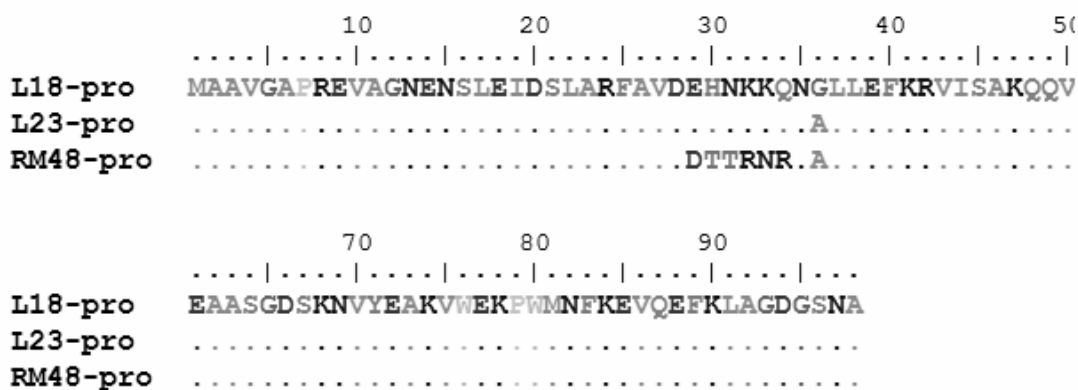
Chúng tôi chọn dòng lạc RM48 có khả năng chịu hạn tốt nhất, giống lạc L23 (chịu hạn tốt) và giống lạc L18 (giống gốc, chịu hạn kém) để so sánh trình tự nucleotide của gen cystatin. Gen cystatin của cây lạc được khuếch đại từ DNA hệ gen có kích thước là 461 nucleotide. Kết quả phân tích cho thấy gen cystatin cây lạc có 2 exon và 1 intron. Đoạn exon thứ nhất gồm 102 nucleotide bắt đầu từ vị trí 1 đến 102; đoạn exon thứ hai có 195 nucleotide, từ vị trí 267 đến 461; vùng intron ở giữa có 164 nucleotide, từ vị trí 103 đến 266.

Kết quả so sánh trình tự nucleotide của gen cystatin phân lập từ dòng lạc RM48, L18, L23 cho thấy, trình tự gen cystatin của dòng RM48 (khả năng chịu hạn cao nhất) có 19 vị trí nucleotide sai khác so với giống L18 (giống gốc, chịu hạn kém), có 23 vị trí nucleotide sai khác so với giống L23 (giống chịu hạn tốt). Trình tự nucleotide của gen

cystatin của giống lạc L18 có 14 vị trí sai khác so với giống L23. Kết quả so sánh vùng exon cho thấy, ở vùng exon 1, dòng RM48 có 12 vị trí sai khác với giống L18 và 12 vị trí sai khác so với giống L23. Ở vùng exon 2, dòng RM48 có 1 vị trí sai khác với giống L18 và có 3 vị trí sai khác so với giống L23.

Protein suy diễn của gen cystatin phân lập từ giống lạc L23, L18 và dòng lạc RM48 có 98 amino acid (hình 3). Trình tự amino acid của cystatin ở dòng lạc RM48 có 7 vị trí amino acid sai khác là 29, 30, 31, 32, 33, 34, 36 so với giống L18 (chịu hạn kém) và có 6 vị trí amino acid sai khác là 29, 30, 31, 32, 33, 34 so với giống L23.

Phân tích mối tương quan của protein cystatin với mức độ chịu hạn của các dòng, giống nghiên cứu nhận thấy, giống L23 chịu hạn tốt khác giống L18 chịu hạn kém ở vị trí 36 (A->G), cystatin của dòng RM48 cũng có sự khác này. Ngoài ra, cystatin của dòng RM48 có sự khác biệt với các trình tự amino acid cystatin của giống lạc L18, L23 ở các vị trí 29, 30, 31, 32, 33, 34, là những vị trí nằm trong vùng CY (từ amino acid 13 đến amino acid thứ 90) và là vị trí lân cận với điểm ức chế proteinase. Như vậy, rất có thể sự khác biệt này đã góp phần làm tăng độ ái lực của chất ức chế với trung tâm hoạt động của cystein proteinase.



Hình 3. So sánh trình tự amino acid trong protein cystatin của dòng lạc RM48, giống L18, L23

Nghiên cứu cơ chế ức chế của cystatin với cystein proteinase, Rawlings et al. (2008) [6] đã chỉ ra rằng, cystatin đóng vai trò như cơ chất để

xâm nhập vào trung tâm hoạt động của enzyme và ngăn chặn việc đi vào của các cơ chất protein khác. Theo Nagata et al. (2000) [5], các amino

acid của cystatin tương tác với cystein proteinase (loại papain) của lúa gồm: vùng đầu NH₂ từ glycine vị trí số 5 tới glycine vị trí số 11, glutamine vị trí số 53 tới tyrosine vị trí số 60 cho vòng ức chế đầu tiên và tryptophan vị trí số 80 đến glutamine vị trí số 91 cho vòng ức chế thứ hai. Vị trí các vùng bảo thủ của các cystatin khác nhau là khác nhau, tuy nhiên thường gặp trong các cystatin là: vị trí glycine- vùng đầu NH₂, vòng lặp thứ nhất là đoạn bảo thủ QxVxG, nằm trong vùng trung tâm của cystatin và vòng lặp thứ 2 là vị trí W (tryptophan) ở vùng đầu COOH. Phần protein còn lại không xâm nhập vào khe hoạt hóa, nhưng lại đóng góp rất đáng kể tới quá trình liên kết và ảnh hưởng mạnh tới tính đặc hiệu của cystatin với cysteine proteinase [4].

KẾT LUẬN

Xử lý mô sẹo của giống lạc L18 bằng thời khô và bằng kết hợp chiếu xạ với thời khô ở ngưỡng chọn lọc thời khô 9 giờ kết hợp với chiếu xạ tia gamma 2 krad đã tạo được 198 dòng lạc có nguồn gốc từ mô sẹo chịu mất nước và mô sẹo chịu chiếu xạ tia gamma kết hợp với thời khô gây mất nước.

Đánh giá khả năng chịu hạn của các dòng chọn lọc ở thế hệ thứ năm đã tuyển chọn được 3 dòng lạc RM48, R46 và RM47 có khả năng chịu hạn cao. Trình tự gen cystatin của dòng lạc chọn lọc RM48 có 19 vị trí nucleotide sai khác so với giống L18 (giống gốc, chịu hạn kém) và có 23 vị trí nucleotide sai khác so với giống lạc L23 (chịu hạn tốt); Trình tự amino acid của cystatin ở dòng RM48 khác với giống L23 ở 6 vị trí amino acid và khác với giống L18 ở 7 vị trí amino acid.

Kết hợp đánh giá khả năng chịu hạn và so sánh trình tự gen cystatin đã chọn được dòng lạc RM48 có khả năng chịu hạn tốt so với giống gốc. Dòng lạc RM48 có nguồn gốc từ mô sẹo chịu mất nước được xử lý kết hợp thời khô 9 giờ với chiếu xạ tia gamma 2 krad có thể giới thiệu tham gia khảo nghiệm để tạo giống lạc chịu hạn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Abdelsamad A., EL-Sayed O. E., Ibrahim H. F., 2007. Development of drought tolerance double haploid wheat using biochemical genetic marker on *in vitro* culture. *J. Appl. Sci. Res.*, 3(11): 1589-1599.
2. Bray E. A., 1993. Molecular responses to water deficit. *Plant Physiol.*, 103: 1035-1040.
3. Lê Trần Bình, Lê Thị Muội, 1998. Phân lập gen và chọn dòng chống chịu ngoại cảnh bất lợi ở cây lúa. Nxb. Đại học Quốc gia Hà Nội, 5-200.
4. Martinez M., Diaz I., 2008. The origin and evolution of plant cystatins and their target cysteine proteinases indicate a complex functional relationship. *BMC Evol. Biol.*, 8: 198.
5. Nagata K., Kudo N., Abe K., Arai S., Tanokura M., 2000. Three dimensional solution structure of oryzacystatin-I, a cysteine proteinase inhibitor of rice (*Oryza sativa* L. japonica). *Biochemistry*, 39: 14753-14760.
6. Rawlings N. D., Morton F. R., Kok C. Y., Kong J., Barrett A. J., 2008. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.*, 36: 320-325.
7. Nguyễn Thị Tâm, Chu Hoàng Mậu, Ngô Thị Liêm, Bùi Thị Hoài Loan, 2006. Nghiên cứu môi trường nuôi cấy in vitro phôi lạc phục vụ nghiên cứu chọn dòng chịu hạn. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ, Đại học Thái Nguyên*, 37(1): 87-92.
8. Valdes R. S., Guerrero R. A., Melgoza V. C., Chagolla L. A., Delgado V. F., Martinez G. N., Sanchez H. N., Delano F. J., 2007. Cloning of a cDNA encoding a cystatin from grain amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) showing a tissue-specific expression that is modified by germination and abiotic stress. *Plant Physiol. Biochem.*, 45: 790-798.
9. http://www.fcrl.com.vn/article_d/c252-280/giong-lac-118/article_d/c252-280.

GENERATION OF PEANUT LINE WITH DROUGHT TOLERANCE BY PLANT CELL TECHNOLOGY

Vu Thi Thu Thuy, Nguyen Thi Tam, Chu Hoang Mau

Thai Nguyen University of Education

SUMMARY

Scar tissue of peanut cultivar L18 was processed by dry blower during 9 hours and in combination with gamma ray irradiation with dose of 2 krad and results showed that 198 peanut lines have been generated. By evaluation of drought tolerance of selected peanut lines at the fifth generation, 3 peanut lines RM48, RM47 and R46 with highly drought tolerance were chosen, of which RM48 line derived from callus dehydration tolerance and radiation tolerance proved to be the best drought tolerance. Cystatin gene sequence of the RM48 peanut line had 19 different nucleotide positions compared with that of the L18 cultivar (original cultivar with low drought tolerance) and had 23 different nucleotide positions compared with that of the L23 cultivar (high drought tolerance). Cystatin of the RM48 line had amino acid sequence which was different at 6 and 7 positions compared with that of the cultivars L23 and L18, respectively. Based on evaluation of drought tolerance and analysis of cystatin gene sequence, the peanut line RM48 was selected. This line derived from dehydrated callus of L18 peanut cultivar by 9 hour dry blow and gamma ray irradiation at the dose of 2 krad. The line RM48 with highly drought tolerance could be introduced to participate in field trial test to generate a new drought-resistant cultivar.

Keywords: Cystatin gene, drought resistance, irradiation resistance, peanut, scar tissue, water loss resistance.

Ngày nhận bài: 3-2-3013