

## KHẢ NĂNG KHÁNG MỌT VÀ ĐẶC ĐIỂM CỦA GEN *VrPDF1* CỦA MỘT SỐ GIỐNG ĐẬU XANH (*VIGNA RADIATA* L. WILCZEK)

Hoàng Thị Thao<sup>1,4</sup>, Hồ Mạnh Trường<sup>2</sup>, Nguyễn Thị Ngọc Lan<sup>1</sup>, Nguyễn Vũ Thanh Thanh<sup>3</sup>, Lê Văn Sơn<sup>2</sup>, Chu Hoàng Mậu<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Sư phạm, Đại học Thái Nguyên

<sup>2</sup>Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

<sup>3</sup>Trường Đại học Khoa học, Đại học Thái Nguyên

<sup>4</sup>Đại học Nông Lâm Bắc Giang

Ngày nhận bài: 28.01.2016

Ngày nhận đăng: 25.3.2016

### TÓM TẮT

Defensin thực vật có tác dụng chống lại côn trùng ăn hạt. Defensin liên kết với trung tâm hoạt động của  $\alpha$ -amylase trong ruột mọt, do đó ức chế quá trình tiêu hóa tinh bột của mọt. Trong nghiên cứu này, tám giống đậu xanh được đánh giá khả năng kháng mọt bằng phương pháp lây nhiễm mọt nhân tạo. Giống đậu Tầm TH có chỉ số mẫn cảm mọt thấp nhất (634,63) và giống ĐX22 có chỉ số mẫn cảm mọt cao nhất (1058,72). Giống đậu Tầm TH có khả năng kháng mọt cao nhất, giống đậu xanh ĐX22 có khả năng kháng mọt kém nhất. Gen *VrPDF1* phân lập từ cây đậu xanh có cấu trúc phân đoạn, gồm hai exon và một intron với kích thước 356 bp. Đoạn mã hóa của gen *VrPDF1* có kích thước 228 bp, mã hóa 75 amino acid. Trình tự cDNA của hai giống đậu Tầm TH và ĐX22 khác nhau ở 13 nucleotide, trình tự amino acid sai khác ở 9 vị trí amino acid. Vùng intron của gen *VrPDF1* của hai giống đậu Tầm TH và ĐX22 sai khác ở 5 vị trí nucleotide. Khoảng cách di truyền dựa trên trình tự nucleotide của đoạn mã của giống đậu xanh ĐX22 và bảy giống đậu xanh khác là 6,2% và dựa trên trình tự amino acid suy diễn là 7,7%. Gen *VrPDF1* (cDNA) phân lập từ giống đậu Tầm TH kháng mọt tốt nhất được sử dụng để thiết kế vector chuyển gen trong mục đích tạo cây đậu xanh chuyển gen kháng mọt.

**Từ khóa:** *Callosobruchus chinensis*, defensin, đậu xanh, gen *VrPDF1*, tính kháng mọt

### MỞ ĐẦU

Đậu xanh (*Vigna radiata* L. Wilczek) là một trong ba cây đậu đỗ chính trong nhóm các cây đậu ăn hạt và là cây trồng có vị trí quan trọng trong nền nông nghiệp của nhiều nước, trong đó có Việt Nam. Trồng đậu xanh không những cung cấp nguồn thực phẩm giàu đạm, đáp ứng nhu cầu về dinh dưỡng của con người và vật nuôi mà còn có tác dụng cải tạo và bồi dưỡng đất, do rễ cây đậu xanh có các nốt sần chứa vi sinh vật cố định đạm sống cộng sinh (Đường Hồng Dật, 2006; Lê Khả Tường *et al.*, 1998).

Nước ta có nhiều thuận lợi để phát triển sản xuất nông nghiệp song cũng có nhiều cơ hội tốt để sâu hại phát sinh phát triển và phá hại nghiêm trọng các loại cây trồng ngoài đồng ruộng cũng như trong kho bảo quản sau thu hoạch. Đối với nhóm nông sản là hạt thì mọt trong những nguyên nhân chính gây tổn thất đến số lượng và chất lượng hạt là do côn trùng mà chủ yếu là Bộ cánh cứng (thường gọi là mọt). Mọt gây hại đậu xanh (*Callosobruchus chinensis* L.) có mặt

khắp thế giới, các vùng trồng đậu xanh ở nước ta đều có loại mọt này. Chúng không những gây hại trong kho dự trữ mà chúng còn lan truyền và gây hại cả ở ngoài đồng ruộng. Mọt đậu xanh gây hại trên các loại đậu: đậu xanh, đậu tằm, đậu đũa, đậu Hà Lan, đậu đen trong đó hại nặng nhất là đậu xanh với tỷ lệ hại 100% (Bùi Công Hiền, 1995). Sự thiệt hại do chúng gây ra là rất lớn, do đó công tác phòng trừ sâu mọt đậu nói chung và mọt đậu xanh nói riêng đang là một vấn đề cấp thiết cần được quan tâm nghiên cứu. Chính vì vậy việc chọn tạo giống đậu xanh có năng suất cao, chất lượng tốt, có khả năng chống chịu sâu bệnh, côn trùng và những điều kiện khắc nghiệt của thời tiết, khí hậu để đáp ứng nhu cầu lương thực và bảo vệ môi trường đang là nhiệm vụ cấp thiết đối với ngành chọn giống đậu xanh.

Một số nghiên cứu về khả năng kháng côn trùng, kháng nấm, kháng virus đã được tiến hành trên một số loại cây trồng như lúa mì (Colilla *et al.*, 1990), lúa mạch (Mendez *et al.*, 1990), cà chua (Stotz *et al.*, 2009), củ cải (Terras *et al.*, 1995), cải bắp (Park

*et al.*, 2002), hạt tiêu (Oh *et al.*, 1999), ớt chuông (Meyer *et al.*, 1996). Các nghiên cứu đều thống nhất rằng đặc tính kháng một hại hạt (kháng côn trùng) của cây trồng rất phức tạp và liên quan đến hoạt động của gen defensin. Defensin thực vật là nhóm chuỗi peptide nhỏ đặc trưng bởi cấu trúc gấp cuộn ba chiều qua tám cầu nối disulfide của các cysteine. Defensin thực vật hoạt động mạnh sẽ tổng hợp protein ức chế, ảnh hưởng đến chức năng kênh ion, tác động đến hoạt động của  $\alpha$ -amylase và trypsin, làm suy yếu vi sinh vật (Cavalho *et al.*, 2011). Cơ chế gây độc của defensin đối với côn trùng ở hạt đậu xanh được mô tả như là sự cản trở enzyme phân giải tinh bột, làm cho một không thể tồn tại được. Khi một ăn hạt đậu xanh, defensin đã ức chế hoạt động của  $\alpha$ -amylase, do đó ngăn chặn sự tiêu hóa tinh bột, kìm hãm sự sinh trưởng, phát triển và dần một sẽ chết (Stotz *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2006). Trong những năm gần đây đã có một số nghiên cứu về cấu trúc và hoạt tính sinh học của defensin thực vật, đề xuất ứng dụng trong công nghệ sinh học trong nghiên cứu chức năng của gen defensin và nâng cao khả năng kháng một ở cây đậu xanh (Cavalho *et al.*, 2009, 2011; Dos *et al.*, 2010; Stotz *et al.*, 2009; Tavars *et al.*, 2008).

Trong bài báo này chúng tôi trình bày kết quả đánh giá khả năng kháng một và phân tích đặc điểm của trình tự gen *VrPDF1* phân lập từ cây đậu xanh, phục vụ thiết kế vector chuyển gen *VrPDF1* trong mục đích nâng cao khả năng kháng một của cây đậu xanh.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Sử dụng hạt của 8 giống đậu xanh làm vật liệu nghiên cứu, trong đó 6 giống do Viện Cây lương thực và Thực phẩm cung cấp (Tầm TH, ĐX11, ĐX22, ĐXVN5, ĐXVN6, ĐX14) và 2 giống do Viện nghiên cứu Ngô cung cấp (ĐX17, V123).

Đánh giá khả năng kháng một của các giống đậu xanh bằng phương pháp lây nhiễm một nhân tạo theo Tomooka và đồng tác giả (1992), Hà Quang Hùng (2005). Sử dụng 3 cặp một đậu xanh (*C. chinensis*) ban đầu thả vào hộp nhựa đựng thức ăn là hạt đậu xanh có nắp gắn lưới ngăn côn trùng (100g ban đầu) và theo dõi các chỉ tiêu như trọng lượng hạt đậu xanh hao hụt, hệ số gia tăng quần thể, tỷ lệ nhiễm một ở các thời điểm sau 15 ngày, sau 30 ngày, sau 45 ngày và sau 60 ngày nhiễm một và xác định chỉ số mầm cảm với một của các giống đậu xanh. Thí nghiệm

chia làm 2 lô theo dõi, lô thí nghiệm (thả một) nhắc lại 3 lần và lô đối chứng (không thả một).

Trọng lượng hạt đậu xanh hao hụt ở lô thí nghiệm được tính theo công thức:  $P = X - P_t - P_0$  (g), trong đó: P là trọng lượng hạt hao hụt ở công thức thí nghiệm (g),  $P_t$  là trọng lượng hạt cân được sau thời gian thí nghiệm,  $P_0$  là trọng lượng hạt hao hụt ở công thức đối chứng, X là trọng lượng hạt đưa vào thí nghiệm (g) (Hà Quang Hùng, 2005).

Hệ số gia tăng quần thể (r) xác định theo công thức:  $N_t = N_0 \times e^{rt}$ , trong đó:  $N_t$  là số lượng cá thể một ở thời điểm t,  $N_0$  là số lượng cá thể một đưa vào thí nghiệm ban đầu, r: hệ số gia tăng quần thể (Hà Quang Hùng, 2005).

Xác định tỷ lệ nhiễm một = (Số hạt bị nhiễm một / tổng số hạt thí nghiệm) x 100 (%)

Chỉ số mầm cảm một tương đối (S) được tính theo công thức:

$S = \frac{1}{2} \sin \alpha (a.b + b.c + c.d + d.e + e.f + f.g + g.h + h.i + i.j + j.k + k.l + l.a)$ , trong đó: S là chỉ số mầm cảm một tương đối,  $\alpha$  là góc tạo bởi hai trục mang trị số liền nhau  $\alpha = 360^\circ/12$ , a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l là các chỉ tiêu theo dõi.

DNA tổng số từ mầm các giống đậu xanh được tách bằng dung dịch đệm với CTAB, EDTA và  $\beta$ -Mercapto Ethanol tiến hành theo phương pháp của Murray và cs. (1980) [11]. Sử dụng bộ kit Trizol Reagents (của hãng Invitrogen) để tách chiết RNA tổng số từ các mẫu nghiên cứu theo chỉ dẫn của nhà sản xuất. Sử dụng bộ kit Maxima® First Strand cDNA Synthesis của hãng Fermentas để tổng hợp cDNA từ RNA tổng số đã tách chiết theo quy trình chỉ dẫn của nhà sản xuất. Gen *VrPDF1* được khuếch đại từ DNA hoặc cDNA bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu được thiết kế dựa trên những thông tin về trình tự gen *VrPDF1* của cây đậu xanh đã công bố trên Ngân hàng gen có mã số AB020613 [9]. Cặp mồi *VrPDF1*HindIII (F)/*VrPDF1*Sall (R) có trình tự nucleotide là:

*VrPDF1-HindIII-F*: 5'  
CCAAGCTTGGTTAACAGTTTCTAGTGCACC 3'

*VrPDF1-Sall-R*: 5'  
CGCTCGACGATGGAGAAGAAATCACTGGCC 3'

Kích thước gen dự kiến là 356 bp và kích thước cDNA dự kiến là 228 bp.

Chu kỳ nhiệt của PCR là 94°C/4 phút, lặp lại 30 chu kỳ, mỗi chu kỳ là 94°C/45 giây, 58°C/30 giây, 72°C/60 giây) và 72°C/10 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1,5%; tinh sạch sản phẩm PCR bằng bộ kit GeneJET PCR Purification và tách dòng phân tử theo Sambrook và Russell (2001).

Trình tự gen *VrPDF1* được xác định bằng thiết bị giải trình tự gen tự động ABI Prism 3130. Số liệu được phân tích bằng phần mềm Blast, BioEdit, DNASTar.

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Kết quả đánh giá khả năng kháng mọt của các giống đậu xanh

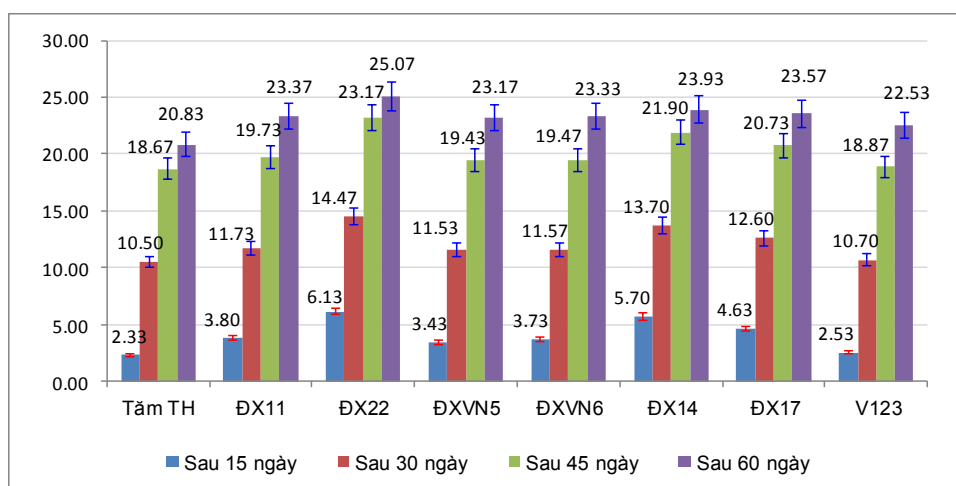
Đánh giá khả năng kháng mọt đã được xác định thông qua chỉ tiêu đánh giá về trọng lượng hao hụt của hạt các giống đậu xanh sau 15, 30, 45, 60 ngày nhiễm mọt được thể hiện ở hình 1.

Kết quả ở hình 1 cho thấy, trọng lượng hạt hao hụt của các giống đậu xanh tăng dần từ ngày nhiễm mọt thứ 15 đến ngày thứ 60. Ở ngày nhiễm mọt thứ 60 trọng lượng hạt hao hụt của giống đậu xanh ĐX22 là cao nhất (25,07g) và thấp nhất là giống Tầm TH (20,83g). Trọng lượng hạt hao hụt của các giống đậu xanh được sắp xếp theo thứ tự giảm dần

ĐX22 > ĐX17 > ĐX14 > ĐX11 > ĐXVN6 > ĐXVN5 > V123 > Tầm TH.

Ngoài ra, chúng tôi còn đánh giá khả năng kháng mọt thông qua các chỉ tiêu hệ số gia tăng quần thể và tỷ lệ nhiễm mọt của các giống đậu xanh qua các thời điểm sau 15 ngày, 30 ngày, 45 ngày và 60 ngày lây nhiễm mọt, kết quả ở bảng 1 cho thấy hệ số gia tăng quần thể mọt của các giống đậu xanh tăng dần từ sau 15 ngày đến 60 ngày nhiễm mọt và sau 60 ngày thì hệ số này bắt đầu giảm do lúc này lượng thức ăn còn ít, hơn nữa số lượng cá thể mọt tăng lên, nên không đủ thức ăn cho quần thể vì thế hệ số tử vong tăng lên. Và ở ngày thứ 45 hệ số gia tăng quần thể mọt cao nhất, trong đó mẫu ĐX22 là cao nhất đạt 0,096 và thấp nhất là mẫu Tầm TH đạt 0,072. Các giống đậu xanh có tỷ lệ nhiễm mọt tăng dần và đến sau 60 ngày thì 3 giống ĐX22, ĐX14 và ĐX17 đã nhiễm mọt trên 99%, còn mẫu ĐX11, ĐXVN5, ĐXVN6 nhiễm trên 90% và thấp nhất là giống Tầm TH nhiễm 87,10%.

Từ các chỉ tiêu theo dõi và đánh giá ở trên cho phép xác định được chỉ số mẫn cảm mọt tương đối của các giống đậu xanh được trình bày ở bảng 1. Giống Tầm TH có chỉ số mẫn cảm mọt thấp nhất (634,63), và giống ĐX22 có chỉ số mẫn cảm mọt cao nhất (1058,72). Kết hợp các kết quả phân tích trên có thể nhận thấy giống Tầm TH có khả năng kháng mọt cao nhất và giống ĐX22 kháng mọt kém nhất.



Hình 1. Biểu đồ so sánh trọng lượng hao hụt giữa các giống đậu xanh sau các thời điểm nhiễm mọt. Các số trên mỗi cột biểu đồ là giá trị trung bình ( $\bar{X}$ ); thành đứng trên cột biểu đồ là giá trị sai số ( $S_x$ )

**Bảng 1.** Kết quả kháng một của các giống đậu xanh qua các giai đoạn nhiễm một.

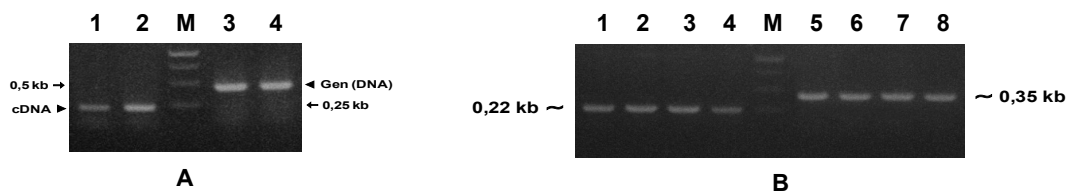
Giống	15 ngày nhiễm một			30 ngày nhiễm một			45 ngày nhiễm một			60 ngày nhiễm một			Chi số S
	P(g)	r	N(%)	P(g)	r	N(%)	P(g)	r	N(%)	P(g)	r	N(%)	
Tầm TH	2,33	0,013	11,90	10,50	0,046	43,23	18,67	0,072	66,60	20,83	0,065	87,10	634,63
DX11	3,80	0,031	14,23	11,73	0,073	52,47	19,73	0,085	74,50	23,37	0,074	92,27	828,89
DX22	6,13	0,052	17,67	14,47	0,080	56,93	23,17	0,096	80,60	25,07	0,080	99,97	1058,72
DXVN5	3,43	0,023	13,27	11,53	0,064	48,63	19,43	0,075	69,50	23,17	0,073	91,47	760,36
DXVN6	3,73	0,026	13,37	11,57	0,067	48,87	19,47	0,076	72,90	23,33	0,072	92,00	792,56
DX14	5,70	0,042	15,63	13,70	0,072	53,60	21,90	0,091	77,90	23,93	0,079	99,87	961,56
DX17	4,63	0,042	15,50	12,60	0,076	53,17	20,73	0,083	77,77	23,50	0,077	99,90	902,88
V123	2,53	0,016	12,47	10,70	0,058	44,67	18,87	0,075	67,90	22,53	0,067	89,80	687,77

Ghi chú: (P(g): trọng lượng đậu xanh hao hụt ở thí nghiệm; r: hệ số gia tăng quần thể một; N(%): tỷ lệ nhiễm một).

### Khuếch đại và tách dòng gen *VrPDF1* từ giống Tầm TH và ĐX22

Lựa chọn hạt của giống Tầm TH (kháng một tốt nhất) và giống ĐX22 (kháng một kém nhất) làm đối tượng để phân tích đặc điểm của gen *VrPDF1*. Kết quả khuếch đại đoạn gen *VrPDF1* từ mRNA và từ DNA hệ gen của hai giống đậu xanh Tầm TH và ĐX22 được thể hiện ở hình 2. Kết quả

điện di kiểm tra sản phẩm PCR ở hình 2A cho thấy băng DNA có kích thước khoảng 0,25kb và 0,35kb đúng như tính toán lý thuyết về kích thước cDNA và kích thước của gen *VrPDF1*. Kích thước của các đoạn DNA ở hình 2B cũng cho thấy kết quả chọn dòng thành công và các dòng khuẩn lạc dương tính với PCR được sử dụng tách chiết plasmid tái tổ hợp phục vụ việc xác định trình tự nucleotide.



**Hình 2.** A. Sản phẩm RT-PCR nhân cDNA *VrPDF1* và sản phẩm PCR nhân gen *VrPDF1* của hai giống Tầm TH và ĐX22 (M: Thang DNA chuẩn 1 kb plus; 1, 2: đoạn cDNA phân lập từ mRNA của giống Tầm TH, ĐX22; 3, 4: đoạn gen (DNA) phân lập từ DNA hệ gen). B. Sản phẩm colony-PCR nhân đoạn cDNA và nhân gen *VrPDF1* từ các dòng khuẩn lạc (M: Thang DNA chuẩn 1 kb plus; 1, 2, 3, 4: các dòng khuẩn lạc chứa vector mang cDNA *VrPDF1*; 5, 6, 7, 8: các dòng khuẩn lạc chứa vector mang gen *VrPDF1*).

### Đặc điểm của gen *VrPDF1* phân lập từ hai giống đậu xanh khác nhau về khả năng kháng một

#### Đặc điểm của đoạn mã hóa thuộc gen *VrPDF1* phân lập từ mRNA

Kết quả đọc trình tự nucleotide cho thấy đoạn cDNA *VrPDF1* có 228 bp và bằng BLAST trong NCBI cho thấy so với trình tự gen *PDF1* mang mã số AB020613.1, đoạn mã hóa của gen *VrPDF1* phân lập từ mRNA của giống Tầm TH có độ tương đồng

99% và của ĐX22 là 96%. Như vậy, có thể kết luận rằng gen *VrPDF1* đã được phân lập và tách dòng thành công từ mRNA của giống đậu xanh kháng một tốt nhất (Tầm TH) và giống kháng một kém nhất (ĐX22). Trình tự nucleotide của gen *VrPDF1* (cDNA) phân lập từ hai giống Tầm TH và ĐX22 đã được đăng ký trên ngân hàng gen với mã số LN913082.1 và LN913083.1. Tuy nhiên, giữa ba trình tự nucleotide của gen *VrPDF1* của Tầm TH, ĐX22 và AB020613.1 có sự sai khác ở các vị trí

nucleotide (Bảng 2). So với AB020613.1 gen *VrPDF1* của Tầm TH có 5 vị trí nucleotide sai khác (16, 17, 19, 130, 132) và ĐX22 có 8 vị trí nucleotide (83, 99, 137, 138, 157, 161, 162, 172), trình tự nucleotide của gen *VrPDF1* ở hai giống Tầm TH và ĐX22 khác nhau ở 13 nucleotide.

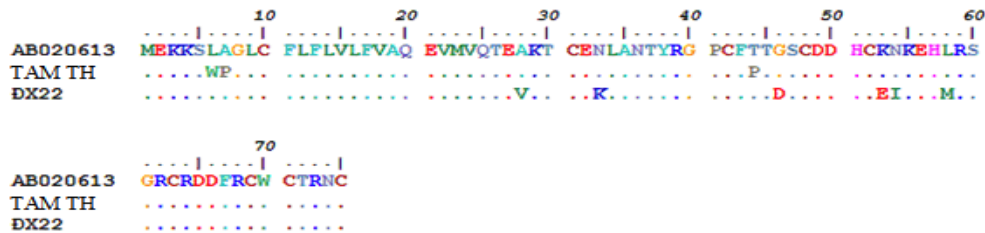
Tiếp tục phân tích, so sánh trình tự amino acid suy diễn từ trình tự cDNA của giống Tầm TH và ĐX22 với protein suy diễn từ AB020613.1 trên Ngân hàng gen, kết quả được thể hiện ở hình 3. Kết quả cho thấy, protein *VrPDF1* gồm 75 amino acid và có độ tương đồng cao. So với protein mang mã số AB020613.1 thì trình tự amino acid suy diễn của giống Tầm TH có độ tương đồng 96%, của mẫu

ĐX22 có độ tương đồng 92%; còn trình tự amino acid suy diễn *VrPDF1* của hai giống đậu xanh tương đồng là 88%. Tuy nhiên, các trình tự amino acid của protein *VrPDF1* cũng có sự khác nhau ở 9 vị trí amino acid. Trình tự amino acid suy diễn từ gen *VrPDF1* của giống Tầm TH khác với mã số AB020613.1 ở 3 amino acid (vị trí 6, 7, 44), còn trình tự amino acid suy diễn từ gen *VrPDF1* của giống ĐX22 khác với mã số AB020613.1 ở 6 amino acid (vị trí 28, 33, 46, 53, 54, 58).

Trình tự gen *VrPDF1* (cDNA) phân lập từ mRNA của giống Tầm TH kháng một tốt nhất được sử dụng để thiết kế vector chuyển gen *VrPDF1* nhằm mục đích nâng cao khả năng kháng một của cây đậu xanh.

**Bảng 2.** Các vị trí nucleotide sai khác giữa ba trình tự nucleotide của gen *VrPDF1*.

TT	Vị trí nucleotide	AB020613	Tầm TH	ĐX22
1	16	C	T	C
2	17	T	G	T
3	19	G	C	G
4	83	C	C	T
5	99	C	C	A
6	130	A	C	A
7	132	C	G	C
8	137	G	G	A
9	138	C	C	T
10	157	A	A	G
11	161	A	A	T
12	162	A	A	T
13	172	C	C	A



**Hình 3.** Trình tự amino acid suy diễn từ gen *VrPDF1* của hai giống Tầm TH, ĐX22 và AB020613.

**Đặc điểm của gen *VrPDF1* phân lập từ DNA tổng số**

Kết quả giải trình tự nucleotide của gen *VrPDF1* phân lập từ DNA tổng số của giống Tầm TH và ĐX22

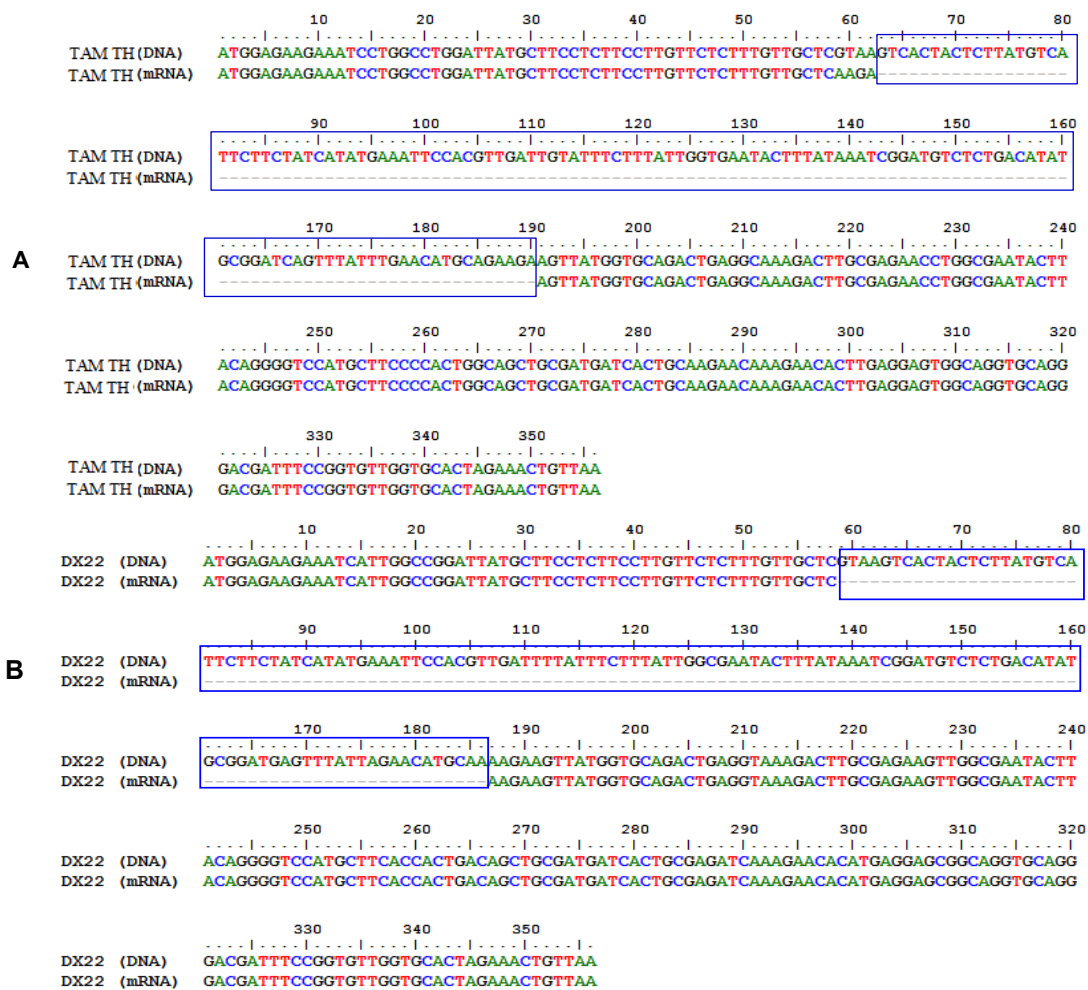
cho thấy gen *VrPDF1* có kích thước 356 bp và bằng BLAST trong NCBI cho thấy độ tương đồng của gen *VrPDF1* so với gen *PDF1* mang mã số AB020613.1 trên GenBank từ 95% đến 99%. Kết quả so sánh trình tự nucleotide của gen *VrPDF1* phân lập từ DNA hệ

gen và gen *VrPDF1* (cDNA) phân lập từ mRNA được thể hiện ở hình 4A, B đã khẳng định gen *VrPDF1* (DNA) đã phân lập thành công từ hệ gen hai giống đậu xanh Tầm TH và ĐX22.

Kết quả so sánh ở hình 4A, B cho thấy gen *VrPDF1* phân lập từ DNA của hai giống Tầm TH và ĐX22 đều gồm 2 exon, kích thước là 228 bp xen kẽ bởi 1 intron có kích thước 128 bp. Tuy nhiên ở gen *VrPDF1* của Tầm TH exon 1 từ nucleotide số 1 đến 62, exon 2 từ nucleotide thứ

191 đến 356, intron từ nucleotide 63 đến 190. Ở gen *VrPDF1* của ĐX22, exon 1 từ nucleotide số 1 đến 58, exon 2 từ nucleotide thứ 171 đến 356, intron từ nucleotide 59 đến 186. Hai trình tự gen *VrPDF1* của giống Tầm TH và ĐX22 đã được Ngân hàng gen quốc tế chấp nhận đăng ký với các mã số LN901494, LN901495.

Khi so sánh vùng intron của gen *VrPDF1* ở Tầm TH và ĐX22 cho thấy có 5 vị trí nucleotide sai khác là 112, 127, 167, 176, 186.



**Hình 4.** So sánh trình tự nucleotide của cDNA gen *VrPDF1* phân lập từ giống Tầm TH (A) và từ ĐX22 (B). Khung xanh là đoạn intron, phần không đóng khung là các đoạn exon.

**Sự đa dạng về trình tự nucleotide của vùng mã hoá của gen *VrPDF1* ở cây đậu xanh**

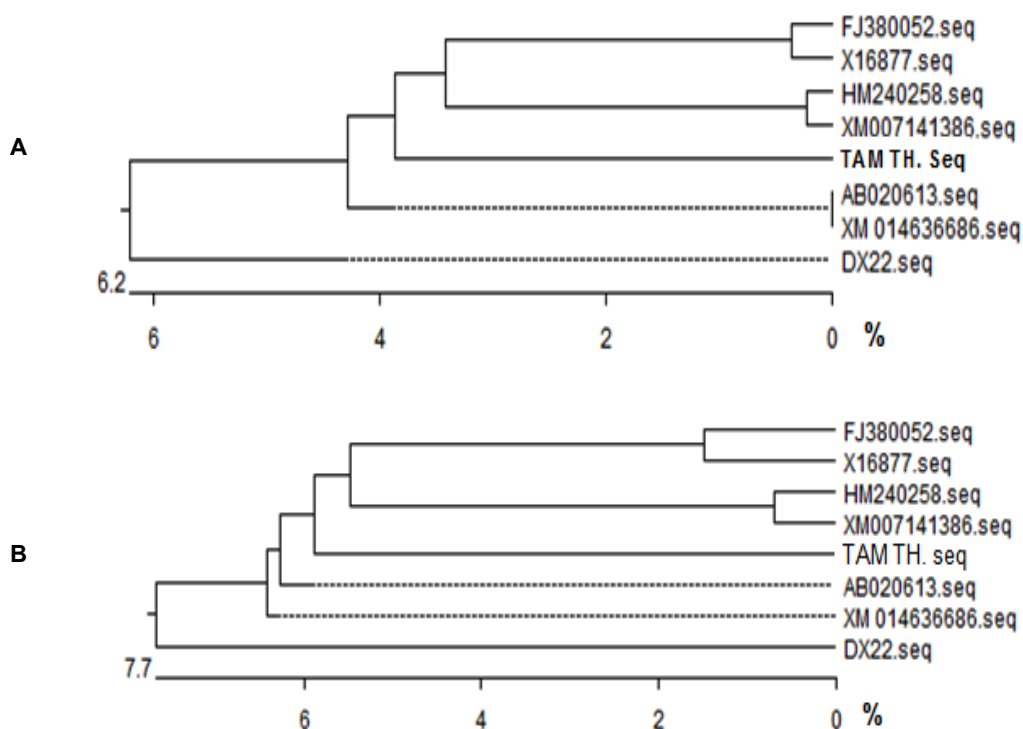
Để đánh giá mức độ đa dạng trong trình tự

nucleotide của gen *VrPDF1*, vùng mã hoá của gen *VrPDF1* phân lập từ các giống đậu xanh có mã số trên Ngân hàng gen đã được phân tích và so sánh. Sơ đồ hình cây ở hình 5A cho thấy 8 trình tự gen

*VrPDF1*, chia thành hai nhóm lớn, với khoảng cách di truyền là 6,2%. Hai giống ĐX22 và Tầm TH phân bố ở hai nhóm khác nhau.

Dựa trên trình tự amino acid suy diễn của 8 trình

tự gen, sơ đồ hình cây ở hình 5B cho thấy các giống đậu xanh phân bố ở hai nhánh, nhánh thứ nhất chỉ có ĐX22 và 7 giống còn lại phân bố ở nhánh thứ hai với khoảng cách di truyền là 7,7%.



**Hình 5.** Sơ đồ hình cây thể hiện sự khác biệt di truyền về trình tự nucleotide của đoạn mã hoá (A) và trình tự amino acid (B) của gen *VrPDF1*.

## KẾT LUẬN

Trong 8 giống đậu xanh được đánh giá khả năng kháng một, giống Tầm TH có khả năng kháng một cao nhất và giống ĐX22 có khả năng kháng một kém nhất. Gen *VrPDF1* phân lập từ cây đậu xanh có cấu trúc phân đoạn, gồm hai exon và một intron với kích thước 228 nbp, mã hóa 75 amino acid. Trình tự cDNA của hai giống Tầm TH và ĐX22 khác nhau ở 13 nucleotide, trình tự amino acid sai khác ở 9 vị trí amino acid. Vùng intron của gen *VrPDF1* của hai giống Tầm TH và ĐX22 sai khác ở 5 vị trí nucleotide. Khoảng cách di truyền dựa trên trình tự nucleotide của đoạn mã của giống đậu xanh ĐX22 và bảy giống đậu xanh khác là 6,2% và dựa trên trình tự amino acid

suy diễn là 7,7%. Gen *VrPDF1* (cDNA) phân lập từ giống Tầm TH kháng một tốt nhất được sử dụng để thiết kế vector chuyển gen trong mục đích tạo cây đậu xanh chuyển gen kháng một.

**Lời cảm ơn:** Công trình được hoàn thành có sự dụng thiết bị Phòng thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ gen - Viện Công nghệ sinh học và Phòng thí nghiệm Công nghệ gen, Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm, Đại học Thái Nguyên.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bùi Công Hiến (1995) *Côn trùng hại kho*. Nxb khoa học và kỹ thuật, Hà Nội.



- Carvalho AO, Gomesa VM (2009) Plant defensins-prospects for the biological functions and biotechnological properties. *Peptides* 30(5): 1007-1020.
- Carvalho Ade O, Gomes VM (2011) Plant defensins and defensin-like peptides - biological activities and biotechnological applications. *Curr Pharm Des* 17(38): 4270-4293.
- Colilla FJ, Rocher A, Mendez E (1990)  $\gamma$ -purothionins: amino acid sequence of two polypeptides of a new family of thionins from wheat endosperm. *FEBS* 270 (1,2): 191-194.
- Dos Santos IS, Carvalho Ade O, de Souza-Filho GA, do Nascimento VV, Machado OL, Gomes VM (2010) Purification of a defensin isolated from *Vigna unguiculata* seeds, its functional expression in *Escherichia coli*, and assessment of its insect alpha-amylase inhibitory activity. *Protein Expr Purif* 71(1): 8-15.
- Đường Hồng Dật (2006) *Cây đậu xanh. Kỹ thuật thâm canh và biện pháp tăng năng suất, chất lượng sản phẩm*. Nxb Lao Động - Xã hội: 5-31.
- Hà Quang Hùng (2005) *Giáo trình kiểm dịch thực vật và dịch hại nông sản sau thu hoạch*. Nxb Nông nghiệp Hà Nội.
- Stotz HU., Spence B, Wang Y (2009) A defensin from tomato with dual function in defense and development. *Plant Mol Biol* 71(1-2): 131-143.
- Stotz HU., Thomson JG and Wang Y. (2009) Plant defensins defense, development and application. *Plant Signal Behav* 4(11): 1010-1012.
- Liu YJ, Cheng CS, Lai SM, Hsu MP, Chen CS, Lyu PC. (2006) Solution structure of the plant defensin VrD1 from mung bean and its possible role in insecticidal activity against bruchids. *Proteins* 4: 777-786.
- Meyer B, Houlné G, Pozueta-Romero J, Schantz ML and Schantz R (1996) Fruit-specific expression of a defensin-type gene family in bell pepper. Up regulating during ripening and upon wounding. *Plant Physiol* 112(2): 615-622.
- Mendez E, Moreno A, Colilla F, Pelaez F, Limas GG, Mendez R, et al (1990) Primary structure and inhibition of protein synthesis in eukaryotic cell-free system of a novel thionin, g-hordothionin, from barley endosperm. *Eur J Biochem* 194(2): 533-539.
- Murray M G, Thompson WF (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucl Acids Res* 8(19): 4321-4325.
- Oh BJ, Ko M k, Kostenyuk I, Shin B and Kim KS, Co (1999) Coexpression of a defensin gene and a thionin-like via different signal transduction pathways in pepper and *Colletotrichum gloeosporioides* interactions. *Plant Mol Biol* 41(3): 313-319.
- Park HC, Kang YH, Chun HJ, Koo JC and Cheong YH et al (2002) Characterization of a stamen-specific cDNA encoding a novel plant defensin in Chinese cabbage. *Plant Mol Biol* 50(1): 57-68.
- Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Tavares LS, Santos Mde O, Viccini LF, Moreira JS, Miller RN, Franco OL (2008) Biotechnological potential of antimicrobial peptides from flowers. *Peptides* 29(10): 1842-1851.
- Terras FRG, Eggermont K, Kovalev V, Raikhel NV and Osborn RW et al (1995) Small cysteine-rich antifungal proteins from radish, their role in host defense. *Plant Cell* 7(5): 573-588.
- Tomooka N, Lairungeang C, Nakeeraks P, Egawa Y and Thavarasook C (1992) Development of Bruchid-Resistant Mungbean Line Using Wild Mungbean Germplasm in Thailand. *Plant Breed* 109(1): 60-66.
- Trần Đình Long, Lê Khả Tường (1998) *Cây đậu xanh*. Nxb Nông nghiệp.

## THE RESISTANT ABILITY TO WEEVILS AND THE CHARACTERISTICS OF *VRPDF1* GENE OF SOME MUNGBEAN CULTIVARS (*VIGNA RADIATA* L.WILCZEK)

Hoàng Thị Thao<sup>1,4</sup>, Ho Manh Tuong<sup>2</sup>, Nguyen Thị Ngọc Lan<sup>1</sup>, Nguyen Vu Thanh Thanh<sup>3</sup>, Le Van Son<sup>2</sup>, Chu Hoang Mau<sup>1,✉</sup>

<sup>1</sup>Thai Nguyen University of Education, Thai Nguyen University

<sup>2</sup>Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

<sup>3</sup>Thai Nguyen University of Sciences, Thai Nguyen University

<sup>4</sup>Bac Giang Agriculture and Forestry University

### SUMMARY

Plant defensins play a role against the seed-feeding insects. Defensin associates with the center of  $\alpha$ -

✉ Author for correspondence: E-mail: [chuhuangmau@tnu.edu.vn](mailto:chuhuangmau@tnu.edu.vn)



amylase activity in the gut of weevils, thus inhibiting the digestion of starch by weevils. In this study, the resistance of eight mungbean cultivars to weevils was evaluated by the method of artificial weevils infection. The Tam TH cultivar had lowest index of susceptibility to weevils (634.63) and DX22 cultivar had highest index (1058.72), and the highest resistance to weevils was found in Tam TH and DX22 was found to have the lowest resistance. *VrPDF1* genes isolated from mungbean cultivars are 356 bp in length with two exons interrupted by an intron. The coding region of the *VrPDF1* gene is 228 bp in length, encoding 75 amino acids. The comparative results of the nucleotide sequence of cDNA between Tam TH and DX22 showed that there was a difference in 13 nucleotides and comparison of amino acid sequences of the deduced protein indicated that there was a difference in 9 amino acids. Within the intron region of the *VrPDF1* genes there was difference in 5 nucleotides. The genetic distance based on nucleotide sequences of the coding region of *VrPDF1* gene of DX22 and seven other mungbean cultivars is 6.2% and based on the amino acid sequence deduced is 7.7%. The coding region of the *VrPDF1* gene of DX22 was used to create a transformation vector aimed at creating weevil-resistant transgenic mungbean.

**Keywords:** *Callosobruchus chinensis*, defensin, mungbean, *VrPDF1* gene, weevil resistance