

**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**

**TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC**

**HUẾ - 2023**

**Công trình được hoàn thành tại:**

Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế.

**Người hướng dẫn khoa học:**

- 1. GS.TS. Nguyễn Hoàng Lộc**
- 2. TS. Nguyễn Xuân Huy**

**Phản biện 1:** .....

**Phản biện 2:** .....

**Phản biện 3:** .....

Luận án sẽ được bảo vệ trước Hội đồng cấp Đại học Huế tại Đại học Huế vào hồi ... giờ ..., ngày ... tháng ... năm 20....

**Có thể tìm hiểu Luận án tại:**

1. Thư viện Quốc gia Việt Nam.
2. Thư viện Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

## 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. Ở Việt Nam, lạc là một trong những cây lấy dầu quan trọng nhất. 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 thân do *Sclerotium rolfsii* gây ra đã trở thành mối đe dọa lớn đối với sản xuất lạc, và đây là bệnh truyền qua đất có sức tàn phá trên toàn 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%. Một số biện pháp phòng trừ được nghiên cứu áp dụng hiện nay như thuốc hóa học, sử dụng các vi sinh vật đối kháng, luân canh cây trồng. 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 họ các enzyme xúc tác quá trình thủy phân các liên kết  $\beta$ -1,4 N-acetyl- $\beta$ -D-glucosamine của chitin. Trong sản xuất nông nghiệp, chitinase là một trong những tác nhân sinh học kháng nấm bệnh ở cây trồng hiệu quả nhất. 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. 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*, *Chit33* và *Chit42* từ *T. harzianum* trong *E. coli*, *ech42* từ *T. aureoviride* trong *Saccharomyces cerevisiae*. Và một số gen mã hóa chitinase từ các sinh vật khác, như *chitinase-3* và *Rchit* từ lúa hoặc chitinase từ thuốc lá đã được đưa vào cây lạc để ngăn ngừa nhiễm nấm. Tuy nhiên, cho đến nay chưa có trường hợp nào biến nạp gen chitinase từ vi sinh vật vào cây lạc, đặc biệt là các loài thuộc chi *Trichoderma*.

Vì vậy, 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. Theo nghiên cứu của Loc & cs (2013), gen chitinase mã hóa chitinase 42 kDa của *T. asperellum* có

hoạt tính mạnh. Tuy nhiên, chưa có nghiên cứu nào công bố về chuyển gen chitinase mã hóa chitinase 42 kDa của *T. asperellum* vào cây lạc để tạo ra dòng lạc có khả năng kháng nấm.

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 được gen chitinase 42 kDa trên cây lạc chuyển gen và tạo được dòng lạc chuyển gen chitinase 42 kDa có khả năng kháng nấm cao.

## **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. rolfisii* 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 cấy 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 rễ 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. rolfsii* của các dòng lạc chuyển gen trong cả điều kiện *in vitro* và *in vivo*.

## **Chương 1. TỔNG QUAN CÁC VẤN ĐỀ NGHIÊN CỨU**

L luận án đã tham khảo và tổng quan về 4 vấn đề chính với các nội dung liên quan: (1) Bệnh héo rũ gốc mốc trắng do nấm *Sclerotium rolfsii* gây ra và biện pháp phòng trừ; (2) Enzyme chitinase; (3) Nâng cao khả năng kháng nấm của cây lạc bằng kỹ thuật chuyển gen; (4) Ứng dụng kỹ thuật chuyển gen nhằm tăng cường khả năng kháng nấm ở cây lạc.

### **1.1. Bệnh héo rũ gốc mốc trắng do nấm *Sclerotium rolfsii* 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.

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**

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.

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

*S. rolfsii* có phạm vi ký chủ rộng với hơn 500 loài thực vật, bao gồm cả cây một lá mầm và hai lá mầm.

#### **1.1.4. Cơ chế kháng nấm bệnh của cây lạc**

Cây lạc (*A. hypogaea* L.) 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*.

#### **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**

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.

## **1.2. Enzyme chitinase**

1.2.1. Sự phân bố chitinase trong tự nhiên

1.2.2. Phân loại chitinase

1.2.3. Cơ chế phản ứng của chitinase

1.2.4. Tình hình nghiên cứu chitinase từ *Trichoderma*

## **1.3. Nâng cao khả năng kháng nấm của cây lạc bằng kỹ thuật chuyển gen**

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

1.3.2. Promoter sử dụng trong chuyển gen thực vật

1.3.3. Tình hình nghiên cứu về promoter đặc hiệu rễ

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

## **1.4. Ứng dụng kỹ thuật chuyển gen nhằm tăng cường khả năng kháng nấm ở cây lạc**

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

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

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. Những nghiên cứu trong nước theo hướng biểu hiện gen chitinase ngoại lai ở cây trồng chưa được công bố nhiều. Hiệu quả chuyển gen chỉ được đánh giá ở mức độ lai Southern, các phân tích biểu hiện gen ở mức độ phân tử cũng như ở điều kiện *in vivo* chưa được thực hiện.

## **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 được mua từ Công Ty Cổ phần Giống cây trồng-Vật nuôi Thừa Thiên Huế.

Cây *Nicotiana benthamiana* do Phòng thí nghiệm Sinh học phân tử thực vật (Đại học Quốc Gia Jeonbuk, Hàn Quốc) cung cấp.

#### **2.1.2. Các vector, chủng vi khuẩn và vi nấm**

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

- Promoter đặc hiệu rễ Asy (pAsy) 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.

- Các gen mã hóa chitinase 42 kDa có mang trình tự peptide tín hiệu của gen amylase 3D ở lúa, bao gồm *Chi42* (NCBI: HM191683.1) là gen hoang dại từ chủng *T. asperellum* SH16, *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**

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

2.2.2. Tối ưu hóa trình tự gen *chi42*

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

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

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

2.2.6. Tam hợp



- 2.2.7. Chuyển gen chitinase bằng kỹ thuật thẩm nhập
- 2.2.8. Biến nạp gen chitinase thông qua *Agrobacterium*
- 2.2.9. Nhận dạng và phân tích biểu hiện của gen chuyển
- 2.2.10. Thử nghiệm hoạt tính kháng nấm của chitinase thực vật
- 2.2.11. Đặc điểm sinh lý và hóa sinh của cây lạc chuyển gen *in vivo*
- 2.2.12. Xử lý thống kê

### **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

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

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 ở bảng 3.1 cho thấy khi tăng thời gian khử trùng thì tỷ lệ hạt chết tăng còn tỷ lệ hạt nhiễm giảm. 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.

**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 <sub>2</sub>	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 <sub>3</sub>	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

#### 3.1.2. Ảnh hưởng của phương thức nảy mầm

Kết quả cho thấy phương thức bóc vỏ lụa và tách đôi hạt của giống lạc L14 sau 3 ngày hạt đã nhú mầm và sau 8 ngày đã lên cây.

**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

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

Kết quả nghiên cứu cho thấy hơn 81% cây lạc giống L14 đã nảy mầm trên môi trường MS sau 3 ngày nuôi cấy và đến ngày thứ 7 đã phát triển thành cây *in vitro* hoàn chỉnh. Cây con được cắt thành các mẫu cây 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. 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.

**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 cây	Tỷ lệ tái sinh (%)	Số chồi trên mẫu	Chiều dài chồi (cm)
Chồi đỉnh	95	1,6 <sup>b</sup>	3,1 <sup>b</sup>
Trụ trên lá mầm	50	2,3 <sup>a</sup>	2,9 <sup>b</sup>
Trụ dưới lá mầm	40	1,8 <sup>b</sup>	2,6 <sup>b</sup>
Mắt lá mầm	100	1,0 <sup>b</sup>	6,6 <sup>a</sup>

### 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.** 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 <sup>bc</sup>	2,4 <sup>ab</sup>
2	21,9	2,9 <sup>ab</sup>	2,6 <sup>ab</sup>
3	31,3	3,1 <sup>ab</sup>	2,7 <sup>ab</sup>
4	40,6	3,8 <sup>a</sup>	3,0 <sup>a</sup>
5	43,8	3,0 <sup>ab</sup>	2,9 <sup>ab</sup>
Đối chứng	12,5	1,9 <sup>c</sup>	2,3 <sup>b</sup>

### 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 nhưng chỉ 1 chồi/mẫu đối với lá mầm có phôi trong môi trường có bổ sung BAP 4 mg/L.

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

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

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

Chồi *in vitro* cây lạc được chuyển vào 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 hợp chất này đã 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 0,5 mg/L với tỷ lệ tạo rễ 100% và rễ hình thành sớm hơn, chỉ sau 9-12 ngày nuôi cấy.

**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 <sup>b</sup>
	0,3	87,5	4,4 <sup>b</sup>
	0,5	100	10,9 <sup>a</sup>
IBA	0,1	75,0	3,4 <sup>b</sup>
	0,3	62,5	2,6 <sup>c</sup>
	0,5	50,0	1,9 <sup>c</sup>
Đối chứng	0,0	50,0	1,5 <sup>c</sup>

## 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.

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

Đã tạo dòng thành công các gen chitinase trong vector biểu hiện *E. coli* pQE30.

### 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 enzyme chitinase (Ta-CHI42) khi được cảm ứng với IPTG.

### 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. Nồng độ Ta-CHI42 tinh sạch thu được theo tính toán khoảng 4 µg/µL. Sau khi được thẩm tách với đệm PBS (pH 7,4), nồng độ cuối cùng của enzyme xấp xỉ 1,5 µg/µL.

Ta-CHI42 tinh sạch sau đó được tiêm vào dưới da chuột Balb/c. 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.

### **3.2.5. Hoạt tính thủy phân chitin của Ta-CHI42**

Ta-CHI42 đã được biểu hiện ở dạng hoạt động với hoạt tính cao trong tế bào *E. coli*.

### **3.2.6. Đặc điểm của Ta-CHI42**

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%.

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

Kết quả 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.

## **3.3. Thiết kế các cấu trúc biểu hiện chitinase ở thực vật**

### **3.3.1. Tạo dòng gen chitinase vào vector pMYV719**

Các gen mã hóa chitinase (*Chi42*, *syncodChi42-1* và *syncodChi42-2*) có nguồn gốc từ *T. asperellum* SH16 đã được tạo dòng trong vector biểu hiện thực vật pMYV719.

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

#### **3.3.2.1. Tạo dòng promoter pAsy trong vector pMYV719**

Phản ứng cắt hạn chế bằng *Hind*III và *Xba*I đã xác nhận chèn thành công promoter Asy vào vector gốc pMYV719.

#### **3.3.2.2. Tạo dòng gen chitinase vào vector pMYV719/Asy**

Khuếch đại PCR và phản ứng cắt hạn chế bằng *Xba*I và *Sac*I đã xác nhận sự hiện diện của các gen chitinase trong nhóm vector pNHL20 bao gồm pNHL20.1 (*Chi42*), pNHL20.2 (*syncodChi42-1*), pNHL20.2 (*syncodChi42-2*).

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

Khuếch đại PCR các gen chitinase với các cặp mồi đặc hiệu và phản ứng cắt hạn chế đã xác nhận sự hiện diện của các vector pNHL19 và pNHL20 trong vi khuẩn *Agrobacterium*.

### **3.4. Biểu hiện tạm thời gen chitinase trong cây *N. benthamiana***

#### **3.4.1. Biểu hiện tạm thời các gen chitinase trong cây *N. benthamiana***

Hai 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**

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.

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

Hoạt tính kháng nấm của Ta-CHI42-1 và Ta-CHI42-2 từ *N. benthamiana* được đồng xâm nhiễm bằng hai vector, pNHL19.1 và pNHL19.2 với pMYV508, sau 7 ngày xâm nhiễm được trình bày trong bảng 3.8. Nấm *S. rolfsii* đã bị ức chế sinh trưởng trên môi trường chứa Ta-CHI42.

### **3.5. Ảnh hưởng của một số yếu tố lên hiệu quả chuyển gen chitinase vào cây lạc qua trung gian *A. tumefaciens***

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, lây nhiễm 20 phút ở  $OD_{600} = 1,0$  và đồng nuôi cấy với vi khuẩn trong tối 3 ngày trên môi trường có bổ sung 200  $\mu$ M cefotaxime; 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***

#### **3.6.1. Chuyển gen chitinase vào cây lạc**

Kết quả biến nạp được trình bày trong bảng 3.9. 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.

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

Loại mẫu	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

### 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*); 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*); trong khi không có chồi tái sinh nào dương tính với PCR được tìm thấy ở các mẫu được biến nạp vector pNHL19.

### **3.6.3. Biểu hiện các gen chitinase trong cây lạc**

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. 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.

### **3.6.4. Hoạt tính thủy phân chitin của chitinase**

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*.

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

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.

Khả năng kháng *S. rolf sii* của các dòng lạc chuyển gen chitinase 42 kDa 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 5,0. Trong đó, các cá thể ở 3 dòng chuyển gen *syncodChi42-2* dưới sự điều khiển của promoter Asy đặc hiệu rễ có 100% 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.

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

### **3.7.1. Chọn giá thể thích hợp**

Giá thể thích hợp gồm hỗn hợp đất : cát : vermiculite (1:1:1) làm nguyên liệu đưa cây lạc *in vitro* ra môi trường tự nhiên.

### **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 từ trồng đến kết thúc ra hoa của các dòng lạc từ 122-144 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	15	20	43	64	122
		NC-2	20	30	58	77	145

**3.7.2.1.2. Chiều cao cây**

Chiều cao cây lạc ở giai đoạn 5 lá thật không thấy sự khác biệt đáng kể. Kể từ giai đoạn 5 lá thật đến lúc ra hoa, chiều cao cây tăng với tốc độ nhanh dần và có sự khác biệt ở các dòng lạc 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 <sup>a</sup>	17,8 <sup>de</sup>	20,8 <sup>d</sup>	29,3 <sup>c</sup>
		S2-4	9,8 <sup>ab</sup>	17,8 <sup>de</sup>	23,0 <sup>bc</sup>	30,0 <sup>bc</sup>
		S2-6	10,6 <sup>a</sup>	17,6 <sup>de</sup>	23,0 <sup>bc</sup>	29,8 <sup>c</sup>
	<i>syncodChi42-1</i>	S1-1	10,6 <sup>a</sup>	17,4 <sup>e</sup>	20,6 <sup>b</sup>	28,1 <sup>cd</sup>
		S1-2	9,9 <sup>ab</sup>	16,8 <sup>f</sup>	21,8 <sup>cd</sup>	27,9 <sup>d</sup>
		S1-3	9,3 <sup>b</sup>	17,4 <sup>e</sup>	20,5 <sup>d</sup>	29,0 <sup>c</sup>
	<i>Chi42</i>	WT-1	9,7 <sup>ab</sup>	15,9 <sup>fg</sup>	20,6 <sup>d</sup>	26,1 <sup>e</sup>
		WT-2	10,0 <sup>ab</sup>	15,9 <sup>fg</sup>	20,4 <sup>d</sup>	26,0 <sup>e</sup>
		WT-3	9,6 <sup>ab</sup>	15,8 <sup>fg</sup>	20,8 <sup>d</sup>	26,8 <sup>de</sup>

pNHL20	<i>syncodChi42-2</i>	S2A-12	10,1 <sup>ab</sup>	22,0 <sup>a</sup>	25,2 <sup>a</sup>	33,0 <sup>a</sup>
		S2A-13	10,0 <sup>ab</sup>	20,0 <sup>bc</sup>	24,6 <sup>ab</sup>	31,6 <sup>ab</sup>
		S2A-14	10,1 <sup>ab</sup>	21,2 <sup>ab</sup>	24,6 <sup>ab</sup>	32,8 <sup>a</sup>
	<i>syncodChi42-1</i>	S1A-9	9,6 <sup>ab</sup>	18,4 <sup>de</sup>	21,6 <sup>cd</sup>	29,6 <sup>c</sup>
		S1A-15	9,8 <sup>ab</sup>	19,6 <sup>c</sup>	23,6 <sup>ab</sup>	29,3 <sup>c</sup>
	<i>Chi42</i>	WTA-2	9,6 <sup>ab</sup>	16,8 <sup>f</sup>	21,4 <sup>cd</sup>	29,7 <sup>c</sup>
WTA-4		9,1 <sup>b</sup>	18,4 <sup>de</sup>	22,2 <sup>cd</sup>	28,8 <sup>c</sup>	
Đối chứng không chuyển gen*			7,2 <sup>c</sup>	15,0 <sup>fg</sup>	18,2 <sup>e</sup>	24,1 <sup>e</sup>

### 3.7.2.1.3. Số cành trên cây

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. 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).

**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 <sup>ab</sup>	4,6 <sup>a</sup>	4,8 <sup>ab</sup>	6,4 <sup>a</sup>	
		S2-4	3,6 <sup>a</sup>	4,8 <sup>a</sup>	5,0 <sup>a</sup>	6,4 <sup>a</sup>	
		S2-6	3,4 <sup>ab</sup>	4,8 <sup>a</sup>	4,8 <sup>ab</sup>	6,4 <sup>a</sup>	
	<i>syncodChi42-1</i>	S1-1	3,4 <sup>ab</sup>	4,6 <sup>a</sup>	4,8 <sup>ab</sup>	6,0 <sup>ab</sup>	
		S1-2	3,6 <sup>a</sup>	4,4 <sup>a</sup>	5,0 <sup>a</sup>	6,2 <sup>ab</sup>	
		S1-3	3,2 <sup>ab</sup>	4,4 <sup>a</sup>	4,8 <sup>ab</sup>	6,4 <sup>a</sup>	
	<i>Chi42</i>	WT-1	3,2 <sup>ab</sup>	4,4 <sup>a</sup>	4,8 <sup>ab</sup>	6,0 <sup>ab</sup>	
		WT-2	3,2 <sup>ab</sup>	4,4 <sup>a</sup>	5,0 <sup>a</sup>	6,2 <sup>ab</sup>	
		WT-3	3,6 <sup>a</sup>	4,6 <sup>a</sup>	4,8 <sup>ab</sup>	6,2 <sup>ab</sup>	
pNHL20	<i>syncodChi42-2</i>	S2A-12	3,6 <sup>a</sup>	4,8 <sup>a</sup>	5,0 <sup>a</sup>	6,8 <sup>a</sup>	
		S2A-13	3,6 <sup>a</sup>	4,6 <sup>a</sup>	5,0 <sup>a</sup>	6,2 <sup>ab</sup>	
		S2A-14	3,4 <sup>ab</sup>	4,8 <sup>a</sup>	5,0 <sup>a</sup>	6,6 <sup>a</sup>	
	<i>syncodChi42-1</i>	S1A-9	3,2 <sup>ab</sup>	4,4 <sup>a</sup>	5,0 <sup>a</sup>	6,0 <sup>b</sup>	
		S1A-15	3,4 <sup>ab</sup>	4,4 <sup>a</sup>	5,0 <sup>a</sup>	6,2 <sup>ab</sup>	
		<i>Chi42</i>	WTA-2	3,6 <sup>a</sup>	4,4 <sup>a</sup>	5,0 <sup>a</sup>	6,4 <sup>ab</sup>
	WTA-4		3,2 <sup>ab</sup>	4,6 <sup>a</sup>	5,0 <sup>a</sup>	6,2 <sup>ab</sup>	
	Đối chứng không chuyển gen			2,8 <sup>b</sup>	3,4 <sup>b</sup>	4,4 <sup>b</sup>	5,6 <sup>b</sup>

### 3.7.2.1.4. Số lá trên cây

Số lá trên cây của các dòng lạc chuyển gen đều cao hơn đối chứng. Tuy nhiên giữa các dòng lạc chuyển gen ít có sự sai khác nhau về số lá.

**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 rộng	Kết thúc ra hoa	Thu hoạch
pNHL19	<i>syncodChi42-2</i>	S2-2	12,4 <sup>ab</sup>	15,2 <sup>cd</sup>	17,2 <sup>bc</sup>	21,2 <sup>b</sup>
		S2-4	12,8 <sup>ab</sup>	15,8 <sup>ab</sup>	17,8 <sup>a</sup>	21,8 <sup>ab</sup>
		S2-6	12,6 <sup>ab</sup>	15,6 <sup>b</sup>	17,6 <sup>ab</sup>	21,6 <sup>ab</sup>
	<i>syncodChi42-1</i>	S1-1	12,4 <sup>ab</sup>	15,4 <sup>bc</sup>	17,4 <sup>b</sup>	21,4 <sup>ab</sup>
		S1-2	12,4 <sup>ab</sup>	15,4 <sup>bc</sup>	17,4 <sup>b</sup>	21,4 <sup>ab</sup>
		S1-3	12,4 <sup>ab</sup>	15,6 <sup>b</sup>	17,6 <sup>ab</sup>	21,6 <sup>ab</sup>
	<i>Chi42</i>	WT-1	11,0 <sup>c</sup>	14,4 <sup>d</sup>	16,4 <sup>cd</sup>	20,0 <sup>de</sup>
		WT-2	10,8 <sup>c</sup>	14,6 <sup>cd</sup>	16,4 <sup>cd</sup>	20,0 <sup>de</sup>
		WT-3	11,2 <sup>c</sup>	14,6 <sup>cd</sup>	16,4 <sup>cd</sup>	20,2 <sup>cd</sup>
pNHL20	<i>syncodChi42-2</i>	S2A-12	13,0 <sup>a</sup>	16,6 <sup>a</sup>	18,4 <sup>a</sup>	22,2 <sup>a</sup>
		S2A-13	12,8 <sup>ab</sup>	15,8 <sup>ab</sup>	18,0 <sup>a</sup>	22,0 <sup>ab</sup>
		S2A-14	13,0 <sup>a</sup>	15,8 <sup>ab</sup>	18,2 <sup>a</sup>	22,2 <sup>a</sup>
	<i>syncodChi42-1</i>	S1A-9	12,0 <sup>b</sup>	15,4 <sup>bc</sup>	16,8 <sup>bc</sup>	20,8 <sup>cd</sup>
		S1A-15	12,8 <sup>ab</sup>	15,4 <sup>bc</sup>	17,0 <sup>bc</sup>	21,0 <sup>c</sup>
	<i>Chi42</i>	WTA-2	12,8 <sup>ab</sup>	15,8 <sup>ab</sup>	17,8 <sup>a</sup>	21,8 <sup>ab</sup>
		WTA-4	12,0 <sup>b</sup>	14,8 <sup>cd</sup>	17,0 <sup>bc</sup>	20,8 <sup>cd</sup>
Đối chứng không chuyển gen			9,8 <sup>d</sup>	13,0 <sup>c</sup>	15,6 <sup>d</sup>	19,2 <sup>e</sup>

**3.7.2.2. Cường độ thoát hơi nước**

Cường độ thoát hơi nước ở lá của các dòng lạc chuyển gen qua các giai đoạn sinh trưởng đều cao hơn so với đối chứng không chuyển gen. Trong đó, các dòng lạc chuyển gen *syncodChi42-2* dưới sự điều khiển của promoter Asy đặc hiệu rễ có cường độ thoát hơi nước cao nhất ở thời kỳ ra hoa.

**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 <sup>2</sup> /h)		
			5 lá thật	Ra hoa rộng - đâm tia	Vào quả chắc
pNHL19	<i>syncodChi42-2</i>	S2-2	0,30 <sup>de</sup>	1,15 <sup>cd</sup>	0,56 <sup>fg</sup>
		S2-4	0,68 <sup>a</sup>	1,24 <sup>bc</sup>	0,55 <sup>fg</sup>
		S2-6	0,31 <sup>de</sup>	1,24 <sup>bc</sup>	0,62 <sup>ef</sup>
	<i>syncodChi42-1</i>	S1-1	0,29 <sup>de</sup>	1,24 <sup>bc</sup>	0,69 <sup>cd</sup>
		S1-2	0,28 <sup>de</sup>	1,12 <sup>cd</sup>	0,65 <sup>d</sup>
		S1-3	0,29 <sup>de</sup>	1,28 <sup>b</sup>	0,64 <sup>de</sup>
<i>Chi42</i>	WT-1	0,24 <sup>de</sup>	1,11 <sup>cd</sup>	0,74 <sup>c</sup>	
	WT-2	0,36 <sup>de</sup>	1,10 <sup>cd</sup>	0,66 <sup>d</sup>	
	WT-3	0,41 <sup>cd</sup>	1,02 <sup>d</sup>	0,78 <sup>c</sup>	
pNHL20	<i>syncodChi42-2</i>	S2A-12	0,74 <sup>a</sup>	1,46 <sup>a</sup>	0,99 <sup>a</sup>
		S2A-13	0,62 <sup>a</sup>	1,38 <sup>ab</sup>	0,92 <sup>ab</sup>

	S2A-14	0,49 <sup>bc</sup>	1,46 <sup>a</sup>	0,91 <sup>ab</sup>
<i>syncodChi42-1</i>	S1A-9	0,48 <sup>bc</sup>	1,14 <sup>cd</sup>	0,98 <sup>a</sup>
	S1A-15	0,41 <sup>cd</sup>	1,35 <sup>ab</sup>	0,86 <sup>b</sup>
<i>Chi42</i>	WTA-2	0,36 <sup>de</sup>	1,27 <sup>bc</sup>	0,51 <sup>ef</sup>
	WTA-4	0,28 <sup>de</sup>	1,12 <sup>cd</sup>	0,56 <sup>fg</sup>
Đối chứng không chuyển gen		0,21 <sup>e</sup>	0,10 <sup>d</sup>	0,50 <sup>g</sup>

### 3.7.2.3. Hàm lượng chlorophyll

Hàm lượng Chla và Chlb trong lá của các dòng lạc 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.

**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 <sup>c</sup>	0,90 <sup>f</sup>	0,50 <sup>b</sup>	1,09 <sup>e</sup>	0,37 <sup>c</sup>	0,85 <sup>e</sup>
		S2-4	0,23 <sup>b</sup>	0,95 <sup>de</sup>	0,52 <sup>a</sup>	1,20 <sup>b</sup>	0,41 <sup>b</sup>	1,06 <sup>b</sup>
		S2-6	0,23 <sup>b</sup>	0,93 <sup>e</sup>	0,54 <sup>a</sup>	1,12 <sup>d</sup>	0,38 <sup>c</sup>	0,93 <sup>c</sup>
	<i>syncodChi42-1</i>	S1-1	0,19 <sup>d</sup>	0,89 <sup>f</sup>	0,49 <sup>b</sup>	1,07 <sup>e</sup>	0,35 <sup>d</sup>	0,87 <sup>e</sup>
		S1-2	0,20 <sup>d</sup>	0,89 <sup>f</sup>	0,50 <sup>b</sup>	1,08 <sup>e</sup>	0,36 <sup>d</sup>	0,87 <sup>e</sup>
		S1-3	0,20 <sup>d</sup>	0,889 <sup>f</sup>	0,50 <sup>b</sup>	1,08 <sup>e</sup>	0,36 <sup>d</sup>	0,87 <sup>e</sup>
	<i>Chi42</i>	WT-1	0,18 <sup>d</sup>	0,90 <sup>f</sup>	0,51 <sup>b</sup>	1,05 <sup>e</sup>	0,40 <sup>b</sup>	0,86 <sup>e</sup>
		WT-2	0,19 <sup>d</sup>	0,89 <sup>f</sup>	0,51 <sup>b</sup>	1,05 <sup>e</sup>	0,39 <sup>c</sup>	0,85 <sup>e</sup>
		WT-3	0,19 <sup>d</sup>	0,89 <sup>f</sup>	0,49 <sup>b</sup>	1,08 <sup>e</sup>	0,35 <sup>d</sup>	0,87 <sup>e</sup>
pNHL20	<i>syncodChi42-2</i>	S2A-12	0,24 <sup>a</sup>	1,10 <sup>a</sup>	0,54 <sup>a</sup>	1,29 <sup>a</sup>	0,49 <sup>a</sup>	1,09 <sup>a</sup>
		S2A-13	0,23 <sup>b</sup>	1,01 <sup>b</sup>	0,54 <sup>a</sup>	1,17 <sup>c</sup>	0,45 <sup>a</sup>	1,07 <sup>b</sup>
		S2A-14	0,23 <sup>b</sup>	1,04 <sup>b</sup>	0,54 <sup>a</sup>	1,23 <sup>b</sup>	0,48 <sup>a</sup>	1,04 <sup>b</sup>
	<i>syncodChi42-1</i>	S1A-9	0,20 <sup>d</sup>	0,98 <sup>c</sup>	0,50 <sup>b</sup>	1,14 <sup>d</sup>	0,38 <sup>c</sup>	1,01 <sup>c</sup>
		S1A-15	0,22 <sup>c</sup>	1,01 <sup>b</sup>	0,53 <sup>a</sup>	1,19 <sup>c</sup>	0,45 <sup>a</sup>	0,99 <sup>c</sup>
		<i>Chi42</i>	WTA-2	0,22 <sup>b</sup>	0,93 <sup>c</sup>	0,54 <sup>a</sup>	1,12 <sup>d</sup>	0,38 <sup>c</sup>
	WTA-4		0,21 <sup>c</sup>	0,98 <sup>c</sup>	0,51 <sup>b</sup>	1,17 <sup>c</sup>	0,39 <sup>c</sup>	1,02 <sup>c</sup>
	Đối chứng không chuyển gen		0,15 <sup>e</sup>	0,86 <sup>f</sup>	0,45 <sup>c</sup>	0,98 <sup>f</sup>	0,33 <sup>d</sup>	0,73 <sup>f</sup>

### 3.7.2.4. Các yếu tố cấu thành năng suất

**Số hoa/cây:** Tổng số hoa/cây của các dòng lạc chuyển gen đều cao hơn đối chứng không chuyển gen, dao động từ 24,6-28,0 hoa/cây. Trong đó, dòng S2A-12 có số hoa/cây cao nhất.

**Tỷ lệ hoa hữu hiệu:** Tỷ lệ hoa hữu hiệu nhìn chung không có sự khác biệt giữa các dòng lạc, dao động từ 31,2-37,8%.

**Số quả chắt/cây:** Các dòng lạc chuyển gen đều có số quả chắt/cây cao hơn đối chứng không chuyển gen từ 7,9-39,5%.

**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 dòng đối chứng

không chuyển gen từ 4,1-11,4%.

**Khối lượng 100 hạt:** khối lượng 100 hạt của 18 dòng lạc chuyển gen dao động từ 33,06-38,74 g và đều cao hơn dòng đối chứng không chuyển gen (31,76 g).

**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 <sup>cd</sup>	33,6 <sup>b</sup>	8,6 <sup>c</sup>	114,84 <sup>bc</sup>	35,22 <sup>cd</sup>
		S2-4	25,8 <sup>cd</sup>	34,9 <sup>ab</sup>	9,0 <sup>bc</sup>	115,48 <sup>b</sup>	36,22 <sup>c</sup>
		S2-6	25,8 <sup>cd</sup>	32,5 <sup>b</sup>	8,4 <sup>cd</sup>	115,32 <sup>b</sup>	35,62 <sup>cd</sup>
	<i>syncodChi42-1</i>	S1-1	25,4 <sup>de</sup>	33,1 <sup>b</sup>	8,4 <sup>cd</sup>	112,58 <sup>bc</sup>	33,66 <sup>ef</sup>
		S1-2	25,4 <sup>de</sup>	33,0 <sup>b</sup>	8,4 <sup>cd</sup>	114,88 <sup>bc</sup>	34,54 <sup>de</sup>
		S1-3	25,4 <sup>de</sup>	33,9 <sup>ab</sup>	8,6 <sup>c</sup>	114,70 <sup>bc</sup>	34,54 <sup>de</sup>
	<i>Chi42</i>	WT-1	24,6 <sup>ef</sup>	35,0 <sup>ab</sup>	8,6 <sup>c</sup>	111,66 <sup>c</sup>	33,06 <sup>fg</sup>
		WT-2	24,8 <sup>ef</sup>	33,1 <sup>b</sup>	8,2 <sup>d</sup>	111,86 <sup>c</sup>	33,10 <sup>fg</sup>
		WT-3	24,6 <sup>ef</sup>	34,2 <sup>ab</sup>	8,4 <sup>d</sup>	111,68 <sup>c</sup>	32,28 <sup>gh</sup>
pNHL20	<i>syncodChi42-2</i>	S2A-12	28,0 <sup>a</sup>	37,8 <sup>a</sup>	10,6 <sup>a</sup>	119,50 <sup>a</sup>	38,74 <sup>a</sup>
		S2A-13	27,2 <sup>ab</sup>	34,5 <sup>ab</sup>	9,4 <sup>bc</sup>	115,86 <sup>b</sup>	37,92 <sup>ab</sup>
		S2A-14	27,8 <sup>a</sup>	34,5 <sup>ab</sup>	9,6 <sup>b</sup>	115,86 <sup>b</sup>	37,70 <sup>ab</sup>
	<i>syncodChi42-1</i>	S1A-9	25,8 <sup>cd</sup>	34,1 <sup>ab</sup>	8,8 <sup>bc</sup>	113,58 <sup>bc</sup>	35,64 <sup>cd</sup>
		S1A-15	26,6 <sup>bc</sup>	33,8 <sup>ab</sup>	9,0 <sup>bc</sup>	115,52 <sup>b</sup>	36,94 <sup>b</sup>
	<i>Chi42</i>	WTA-2	25,2 <sup>de</sup>	31,8 <sup>b</sup>	8,0 <sup>d</sup>	113,42 <sup>bc</sup>	33,68 <sup>ef</sup>
		WTA-4	25,2 <sup>de</sup>	34,1 <sup>ab</sup>	8,6 <sup>c</sup>	114,06 <sup>bc</sup>	35,82 <sup>cd</sup>
Đối chứng không chuyển gen			24,4 <sup>f</sup>	31,2 <sup>b</sup>	7,6 <sup>d</sup>	107,26 <sup>d</sup>	31,76 <sup>h</sup>

### 3.7.3. Đặc điểm hóa sinh

#### 3.7.3.1. Hàm lượng protein

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 không chuyển gen (22,35 g/100 g).

#### 3.7.3.2. Hàm lượng lipid

Hàm lượng lipid trong 100 g hạt lạc khô của các dòng lạc chuyển gen dao động từ 48,26-49,15 g và ít có sự sai khác với đối chứng không chuyển gen.

#### 3.7.3.3. Hàm lượng đường khử

Trong các dòng lạc nghiên cứu, hàm lượng đường khử dao động từ 0,92-1,10 g/100 g.

**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 <sup>a</sup>	48,85 <sup>ab</sup>	0,96 <sup>a</sup>
		S2-4	23,45 <sup>a</sup>	48,57 <sup>ab</sup>	0,99 <sup>a</sup>
		S2-6	25,91 <sup>a</sup>	48,61 <sup>ab</sup>	1,10 <sup>a</sup>
	<i>syncodChi42-1</i>	S1-1	24,58 <sup>a</sup>	48,47 <sup>ab</sup>	1,04 <sup>a</sup>
		S1-2	25,76 <sup>a</sup>	48,47 <sup>ab</sup>	0,96 <sup>a</sup>
		S1-3	25,27 <sup>a</sup>	48,67 <sup>ab</sup>	0,93 <sup>a</sup>
	<i>Chi42</i>	WT-1	23,26 <sup>a</sup>	48,26 <sup>b</sup>	0,93 <sup>a</sup>
		WT-2	24,62 <sup>a</sup>	48,26 <sup>b</sup>	1,01 <sup>a</sup>
		WT-3	23,11 <sup>a</sup>	48,32 <sup>b</sup>	0,92 <sup>a</sup>
pNHL20	<i>syncodChi42-2</i>	S2A-12	26,33 <sup>a</sup>	49,15 <sup>a</sup>	1,10 <sup>a</sup>
		S2A-13	25,98 <sup>a</sup>	48,65 <sup>ab</sup>	1,04 <sup>a</sup>
		S2A-14	25,83 <sup>a</sup>	48,57 <sup>ab</sup>	1,01 <sup>a</sup>
	<i>syncodChi42-1</i>	S1A-9	24,96 <sup>a</sup>	48,43 <sup>ab</sup>	0,97 <sup>a</sup>
		S1A-15	25,75 <sup>ab</sup>	49,05 <sup>a</sup>	1,00 <sup>a</sup>
	<i>Chi42</i>	WTA-2	24,47 <sup>c</sup>	48,36 <sup>b</sup>	0,94 <sup>a</sup>
		WTA-4	23,33 <sup>a</sup>	48,39 <sup>b</sup>	0,97 <sup>a</sup>
Đối chứng không chuyển gen			22,35 <sup>d</sup>	47,53 <sup>b</sup>	0,95 <sup>a</sup>

## 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 OD<sub>600</sub> = 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 T<sub>0</sub>. 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. rolfii* 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.



## DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH KHOA HỌC 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.
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.
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.
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.
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.

7. **Phung Thi Bích 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*, pp 1–16.
8. **Phung Thi Bích 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.
9. **Phung Thi Bích 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).

**HUE UNIVERSITY  
UNIVERSITY OF SCIENCES**

-----\*\*\*-----

**PHUNG THI BICH HOA**

**STUDY ON RESISTANCE TO WHITE MOLD DISEASE OF  
*chi42* TRANSGENIC PEANUT (*Arachis hypogaea* L.)**

**Major: Plant Physiology  
Code: 9420112**

**SUMMARY OF DOCTORAL THESIS**

**HUE - 2023**

**The research was completed at:**  
University of Sciences, Hue University

**Supervisors:**

- 1. Prof. Dr. Nguyen Hoang Loc**
- 2. Dr. Nguyen Xuan Huy**

**Reviewer 1:** .....

**Reviewer 2:** .....

**Reviewer 3:** .....

Thesis will be presented at the Hue University Examination Committee  
Meeting at ... date ... month ... year 202.....

**The thesis can be found at:**

1. National Library of Vietnam
2. Library Information Center of University of Sciences, Hue University

# INTRODUCTION

## 1. Rationale

Peanut (*Arachis hypogaea* L.) is a highly important legume crop that is widely cultivated for food and cooking oil in tropical and subtropical regions. In Vietnam, peanuts are one of the most important oil seed crops. They are, however, extremely susceptible to a wide range of phytopathogens, particularly soil-borne fungi, which result in low yields and poor seed quality. In recent years, root and stem rot caused by *Sclerotium rolfsii* has become a great threat to peanut production, and it is a destructive worldwide soil-borne disease. *S. rolfsii* mainly damages the stem base of peanut and causes the whole plant to wither and die and resulting in a reduction of peanut production by 10-80%. Some of the current measures are researched and applied such as using chemical drugs, antagonistic microorganisms and crop rotations. In particular, creating plant varieties carrying anti-disease genes are considered the most effective and economical methods to disease control and environmentally friendly.

Chitinase (EC. 3.2.2.14) are chitinolytic enzymes that catalyzes  $\beta$ -1,4 N-acetyl- $\beta$ -D-Glucosamine linkages in chitin. In agricultural production, chitinase is one of the most effective plant antifungal biological agents. Because of their ability to secrete extracellular chitinases, filamentous fungal species of the genus *Trichoderma* are commonly used as biological control agents against phytopathogenic fungi. To date, several chitinase genes of the *Trichoderma* strains have been cloned and heterologously expressed in suitable hosts such as *Chit46* from *T. harzianum* in *Pichia pastoris*, *Chit33* and *Chit42* from *T. harzianum* in *E. coli*, *ech42* from *T. aureoviride* in *Saccharomyces cerevisiae*. Several genes coding for chitinase from other organisms, such as rice *chitinase-3* and *Rchit*, or tobacco *chitinase*, have been introduced into peanut to prevent fungal infections. However, we did not find any reports of heterologous expression of a chitinase gene from *Trichoderma asperellum*, a biocontrol fungus to peanut.

Therefore, study to chitinase genes transfer from *Trichoderma* to peanut to improve antifungal activity of peanut is an effective, environmentally friendly solution and being applied on many other

crops. According to research by Loc & cs (2013), chitinase gene encoding 42 kDa chitinase from *T. asperellum* has a strong activity. However, no studies have published about chitinase gene encoding 42 kDa chitinase from *T. asperellum* into a peanut to improve antifungal activity of peanut.

For the above reasons, the author desires to carry out the study titled “**Study on resistance to white mold disease of *chi42* transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L.)**”.

## **2. Research objectives**

Expression of 42 kDa chitinase gene in transgenic peanuts and created 42 kDa chitinase transgenic peanut lines with high antifungal resistance.

## **3. Research contents**

(1) Completion of the *in vitro* regeneration system for peanut cultivar L14.

(2) Production of polyclonal antibody against 42 kDa chitinase in mouse to analyze Western blot

(3) Constructing plant expression vectors containing 42 kDa chitinase genes

(4) Transient expression of 42 kDa chitinase genes in *Nicotiana benthamiana*

(5) Research on some factors affecting *Agrobacterium*-mediated 42 kDa chitinase gene transformation into peanut

(6) Research on transformation of 42 kDa chitinase genes into peanuts through *A. tumefaciens*

(7) Research on some physiological and biochemical characteristics of 42 kDa chitinase transgenic peanut lines grown in *in vivo* conditions

## **4. Significances of thesis**

### **4.1. Scientific significance**

The research results of the thesis will provide new and systematic scientific data on optimizing 42 kDa chitinase gene for expression in plants, transgenic vectors, 42 kDa chitinase gene transfer from *T. asperellum* in peanuts to increase resistance to white mold wilt caused by *S. rolfisii*, and at the same time create transgenic peanut lines with good growth and development.

## 4.2. Practical significance

The thesis results are also the basis for applying measures to improve the antifungal resistance of peanuts in order to improve productivity and efficiency in peanut production, contributing to environmental protection. At the same time, the research results of the thesis are published in specialized scientific journals, both domestic and international, which are valuable references for teaching and research.

## 5. New contribution of the thesis

- Established an *in vitro* regeneration protocol for peanut cultivar L14: surface sterilized with 65% NaOCl for 10 minutes, shoot regeneration from various types of explants and shoot multiplication on MS medium containing 4 mg/L BAP and 0.1 mg/L NAA, rooting of individual shoots on MS medium containing 0.5 mg/L NAA.

- Optimized the nucleotide sequence of the wild-type gene *Chi42* encoding 42 kDa chitinase from *T. asperellum* SH16 for the plant expression. Two sequences have been optimized for the codon usage in plant expression and were registered on GenBank with codes MT083802.1 (*syncodChi42-1*) and MT083803.1 (*syncodChi42-2*). The chitinase genes (*Chi42*, *syncodChi42-1*, and *syncodChi42-2*) with root-specific Asy promoter or constitutive promoter dp35S were successfully cloned in plant expression vectors.

- Successfully expressed and purified 42 kDa chitinase in *E. coli*. Simultaneously, this enzyme was used to successfully produce polyclonal antibody against 42 kDa chitinase in mice and can be used for analyzing Western blot.

- The plant expression vectors containing 42 kDa chitinase genes was transferred into *A. tumefaciens* LBA4404 and the genes were expressed at high levels in *N. benthamiana* via agroinfiltration.

- Sixteen L14 peanut lines carrying *Chi42*, *syncodChi42-1*, and *syncodChi42-2* genes with high chitinase expression were successfully transformed and selected. The presence of chitinase genes in these transgenic peanut lines resulted in increased activity against the pathogenic fungus *S. rolfsii* under both *in vitro* and *in vivo* conditions.

## Chapter 1. LITERATURE REVIEW

The thesis referred and summarized on 4 main issues related to: (1) White mold wilt disease caused by *Sclerotium rolfsii* and its control measures; (2) Chitinase enzyme; (3) Improving the resistance of peanuts to fungus by transgenic techniques; (4) Application of transgenic techniques to enhance peanut plants' resistance against phytopathogenic fungi.

### **1.1. White mold wilt disease caused by *Sclerotium rolfsii* and its control measures**

#### **1.1.1. Peanut**

Peanut (*Arachis hypogaea* L.) is a crop that has high economic efficiency and diverse values including nutrition, animal husbandry, cultivation as well as in industry.

In Thua Thien Hue, peanut is also considered as one of the important crops and that it has high economic efficiency. In recent years, in some agricultural production areas of the province, peanut is second only to rice and that it has higher economic efficiency than some other crops. The main varieties of peanut grown in the province are L14, the Central Highlands,... These varieties have a growth period of 120-135 days.

#### **1.1.2. Fungal diseases in peanuts**

Fungal diseases in peanuts account for a greater number and severity of peanut diseases than other pathogens. There are approximately 50 different genera of fungi known to cause diseases in peanuts.

#### **1.1.3. White mold wilt disease caused by *S. rolfsii***

*S. rolfsii* has a wide host range and can infect over 500 plant species. These plant species include both monocotyledonous and dicotyledonous plants.

#### **1.1.4. Mechanisms of resistance to fungal diseases in peanuts**

Peanut is known to produce stilbene-derived compounds in response to infection by microbial pathogens. Stilbenoids in peanuts play an important role in their defense against pathogens, which can inhibit the growth and development of several plant pathogenic fungi, including *Colletotrichum*, *Botrytis*, *Fusarium*, and *Phomopsis*.



### **1.1.5. Current study on measures to prevent diseases caused by *S. rolfsii* in peanuts in the world and in Vietnam**

It is very difficult to control white mold stem wilt caused by *S. rolfsii* because it has a very wide host range, fast growth rate and large number of mycelia, which can persist in the soil for a long time.

### **1.2. Enzyme chitinase**

1.2.1. Distribution of chitinase in nature

1.2.2. Classification of chitinase

1.2.3. The reaction mechanism of chitinase

1.2.4. Current research on chitinase from *Trichoderma*

### **1.3. Improving the resistance of peanuts to fungus by transgenic techniques**

1.3.1. The vector system of gene transformation through *A. tumefaciens*

1.3.2. Promoters use in plant transgenic

1.3.3. Research on root-specific promoter

1.3.4. Changing the genetic code of a target gene to match the expression system

### **1.4. Application of transgenic techniques to enhance peanut plants' resistance against phytopathogenic fungi.**

1.4.1. Regenerative system and gene transfer protocol in peanuts

1.4.2. Research on transferring the chitinase gene into peanuts to improve antifungal resistance

Genes encoding chitinase with resistance to fungal diseases have been noticed in many different plant species, but their presence in peanuts is not yet well-understood. The domestic studies on the expression of foreign chitinase genes in peanuts,

The domestic studies towards foreign chitinase gene expression in plants have been limited, with only Southern hybridization assays used to evaluate transgenic efficiency, gene expression analyses at the molecular level and *in vivo* conditions have not been performed.

## Chapter 2. MATERIAL AND METHODOLOGY

### 2.1. Materials

#### 2.1.1. Plant materials

Peanut cultivar (*A. hypogaea* L.) L14 was provided by Thua Thien Hue Seeds & Livestock Breeds Joint Stock Company.

*Nicotiana benthamiana* was provided by the Laboratory of Plant Molecular Biology (Jeonbuk National University, Korea).

#### 2.1.2. Binary vector, bacteria and fungi

- Plant expression binary pMYV719 vector harboring dp35S promoter and the pMYV508 vector harboring p19 gene was provided by Professor Yang Moon-Sik (Jeonbuk National University, Korea).

- The root-specific Asy promoter (pAsy) was synthesized and cloned in vector pUC19 by PHUSA Bio-Chemistry Co., Ltd. (Can Tho, Vietnam).

- The pQE30 vector

- Genes encoding chitinase 42 kDa with a signal peptide of amylase 3D gene from rice, including *Chi42* (NCBI: HM191683.1) is a wild-type gene from *T. asperellum* SH16, *syncodChi42-1* (NCBI: MT083802.1) and *syncodChi42-2* (NCBI: MT083803.1) are synthetic genes generated from *Chi42* that were optimized for codon usage for plant expression (about 1.3 kb in total length including the signal peptide) were also synthesized and cloned in pUC19 vector by PHUSA Bio-Chemistry Co., Ltd. (Can Tho, Vietnam).

- Bacterial strains: *E. coli* M15, *E. coli* TOP10 and *A. tumefaciens* LBA4404 were provided by the Research Institute of Biological Actives, University of Science, Hue University.

- *Sclerotium rolfsii* was provided by Department of Plant Protection, University of Agriculture and Forestry, Hue University.

### 2.2. Research methods

2.2.1. Completion of the *in vitro* regeneration system for peanut cultivar L14.

2.2.2. Optimization of *chi42* gene

2.2.3. Production of polyclonal antibody against 42 kDa chitinase

2.2.4. Activity determination and characterization of Ta-CHI42

2.2.5. Cloning the chitinase gene and Asy promoter into a plant expression vector

2.2.6. Triparental mating

- 2.2.7. Infiltration of *Agrobacterium*
- 2.2.8. *Agrobacterium*-mediated transformation of the chitinase gene
- 2.2.9. Identifying and analyzing the expression of transgenes
- 2.2.10. The antifungal activity of plant chitinase
- 2.2.11. Physiological and biochemical characteristics of transgenic peanuts *in vivo*
- 2.2.12. Statistical analysis

### 2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

The experiments for the thesis were conducted at the Laboratory of the Department of Biotechnology, Research Institute of Biological Actives, University of Science, Hue University, during the period of 2019-2022.

## Chapter 3. RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1. Completion of the *in vitro* regeneration system for peanut cultivar L14.

#### 3.1.1. Effect of sterilization conditions on the *in vitro* germination of peanut seeds

After washing, peanut seeds were treated with various disinfectants for different durations. Table 3.1 demonstrates that increasing the sterilization time results in a higher percentage of dead seeds but a lower percentage of infected seeds. Disinfecting with 65% NaOCl for 10 minutes resulted in the lowest percentage of infected seeds at only 1.25%. Additionally, NaOCl is less toxic to both plants and users when compared to the other disinfectants. Therefore, 65% NaOCl treated for 10 minutes was chosen for use in this study.

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

Sterilization	Concentration (%)	Time (minute)	Sample infection rate (%)	Sample death rate (%)	Germination rate (%)	Germination day	The day to fully plant
HgCl <sub>2</sub>	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
		5	6,25	22,5	71,25	3	7
	65	10	1,25	17,5	81,25	3	8
		15	0	50,00	50,00	4	10
		5	3,75	23,75	72,50	3	8
AgNO <sub>3</sub>	0,1	10	2,50	37,50	60,00	4	10
		15	1,25	62,50	36,25	4	10

### 3.1.2. Effect of the germination method

The results indicated that the method of peeling the silk and splitting the seeds of the L14 peanut variety resulted in seed germination after 3 days, and a whole plant was formed after 8 days.

**Table 3.2.** Effect of seed germination method

Method	Number of explants	Germination day	Date of whole plant	Rate of whole plant after 10 days (%)
Leave the seeds intact with the skin on.	80	10	18	12,5
Leave the seeds intact and peel off the skin	80	7	12	57,5
Remove the seed skin and split the seeds	80	3	8	77,5

### 3.1.3. Shoot regeneration from various types of explants of *in vitro* peanut.

The present study showed that more than 81% of sterile peanuts cultivar L14 have germinated on MS medium after 3 days of incubation and by day 7 have grown into *in vitro* whole plant. Explants including shoot-tip, hypocotyl, epicotyl, and cotyledon nodes were isolated from seedlings to investigate shoot regeneration on different culture media. The observation found that MS medium containing 4 mg/L BAP and 0.1 mg/L NAA is most suitable.

**Table 3.3.** Shoot regeneration from various types of explants on MS medium containing 4 mg/L BAP and 0.1 mg/L NAA.

Explants	Regenerating explants (%)	No. of shoots per explant	Shoot length (cm)
Shoot-tip	95	1,6 <sup>b</sup>	3,1 <sup>b</sup>
Epicotyl	50	2,3 <sup>a</sup>	2,9 <sup>b</sup>
Hypocotyl	40	1,8 <sup>b</sup>	2,6 <sup>b</sup>
Cotyledon node	100	1,0 <sup>b</sup>	6,6 <sup>a</sup>

### 3.1.4. Effect of BAP on *in vitro* shoot regeneration from hypocotyl

*In vitro* shoots from regenerations were subcultured on MS medium supplemented with BAP from 1-5 mg/L. The highest shoot number obtained at 4 mg/L BAP with 3.8 shoots per explant, regenerating explants of about 40% was relatively high compared to other concentrations of BAP.

**Table 3.4.** Effect of BAP on shoot multiplication of individual shoots from regeneration cultures.

BAP (mg/L)	Regenerating explants (%)	No. of shoots per explant	Shoot length (cm)
1	18,8	2,6 <sup>bc</sup>	2,4 <sup>ab</sup>
2	21,9	2,9 <sup>ab</sup>	2,6 <sup>ab</sup>
3	31,3	3,1 <sup>ab</sup>	2,7 <sup>ab</sup>
4	40,6	3,8 <sup>a</sup>	3,0 <sup>a</sup>
5	43,8	3,0 <sup>ab</sup>	2,9 <sup>ab</sup>
Control	12,5	1,9 <sup>c</sup>	2,3 <sup>b</sup>

### 3.1.5. Effect of BAP on *in vitro* shoot regeneration from embryonic cotyledons

To improve shoot multiplication rate, embryonated cotyledons and de-embryonated cotyledons were cultured on MS medium supplemented with different concentrations of BAP from 1-5 mg/L for investigation of shoot proliferation. Data from table 3.5 shows that regeneration of de-embryonated cotyledons peaked with 6.8 shoots per explant, and 1 shoot for embryonated cotyledons in medium with 4 mg/L BAP.

**Table 3.5.** Shoot regeneration from embryonic cotyledons on MS medium containing 4 mg/L BAP.

Explants	Regenerating explants (%)	No. of shoots per explant	Shoot length (cm)
De-embryonated cotyledon	23,3	6,8 <sup>a</sup>	4,1 <sup>b</sup>
Embryonated cotyledon	86,7	1,0 <sup>b</sup>	5,9 <sup>a</sup>

### 3.1.6. Effect of NAA and IBA on rooting of *in vitro* shoots

*In vitro* peanut shoots were transferred onto MS medium containing NAA and IBA for root induction. The data in table 3.6 indicate that all tested concentrations of two of these plant growth regulators stimulated rooting. However, NAA showed higher efficacy than IBA, the highest number of roots was 10.9 at a

concentration of 0.5 mg/L with a regeneration rate of 100% and roots were formed earlier, only after 9-12 days of culture.

**Table 3.6.** Effect of NAA and IBA on rooting of *in vitro* shoots.

Plant growth regulator (mg/L)	Shoots regenerating roots (%)	No. of roots per rooted shoot	Root length (cm)
NAA	0,1	75,0	4,3 <sup>b</sup>
	0,3	87,5	4,4 <sup>b</sup>
	0,5	100	10,9 <sup>a</sup>
IBA	0,1	75,0	3,4 <sup>b</sup>
	0,3	62,5	2,6 <sup>c</sup>
	0,5	50,0	1,9 <sup>c</sup>
Control	0,0	50,0	1,5 <sup>c</sup>

## 3.2. Production of polyclonal antibody against chitinase in mice

### 3.2.1. Synthesis of chitinase genes

Genes encoding chitinase 42 kDa, including *Chi42* contains a wild-type sequence from *T. asperellum* strain SH16 but has all of its introns removed, *syncodChi42-1* and *syncodChi42-2*, which were optimized for codon usage for plant expression and registered on GenBank with codes MT083802.1, MT083803.1, respectively. These 42 kDa chitinase genes were synthesized and cloned in pUC19 vector and transformed into *E. coli* TOP10 cells.

### 3.2.2. Cloning of chitinase genes in *E. coli* expression vector pQE30

The chitinase genes were successfully cloned in the *E. coli* expression pQE30 vector.

### 3.2.3. Expression of chitinase genes in *E. coli*

*E. coli* cells transformed with the pQE30 vector containing the 42 kDa chitinase genes successfully expressed the chitinase enzyme (Ta-CHI42) when induced with IPTG.

### 3.2.4. Production of polyclonal antibody against chitinase

The purity of Ta-CHI42 which recovered from the affinity chromatography was also checked by SDS-PAGE. The quantity of the purified Ta-CHI42 was to be approximately 4 µg/µL. After being dialyzed against PBS buffer pH 7.4, the final concentration was approximately 1.5 µg/µL.

The purified Ta-CHI42 was injected subcutaneously into mice. Analysis of the immune response in mice by Western blot using anti-His antibody indicated that polyclonal antibody against Ta-CHI42 was greatly produced.

### **3.2.5. Chitinolytic activity of Ta-CHI42**

Ta-CHI42 was expressed in a highly active form in *E. coli* cells.

### **3.2.6. Characterizations of Ta-CHI42**

This study showed that purified Ta-CHI42 enzyme achieved the highest activity of approximately 26 U/mg protein at pH 7 and considerable activities were observed at pH 6-8 (20-26 U/mg protein). The pH stability of Ta-CHI42 was also maintained in the pH range of 6-8 with a relative activity of more than 80%.

### **3.2.7. *In vitro* antifungal activity of Ta-CHI42**

The results showed that the biomass of pathogenic fungi was significantly reduced under the effect of Ta-CHI42. *A. niger* only achieved fresh biomass of 57 mg (approximately 1.63 mg dry biomass), when they were treated with 60 U/mL Ta-CHI42.

## **3.3. Construction of plant expression binary vector**

### **3.3.1. Cloning the chitinase gene into the pMYV719 vector**

Genes encoding chitinase 42 kDa (*Chi42*, *syncodChi42-1* và *syncodChi42-2*) from *T. asperellum* SH16 were cloned in the plant expression vector pMYV719.

### **3.3.2. Cloning the chitinase gene and the Asy promoter into the pMYV719 vector**

#### **3.3.2.1. Cloning pAsy promoter into pMYV719 vector**

The transformants were grown to produce the recombinant vector pMYV719/pAsy, which was then verified by restriction enzymes *XbaI* and *HindIII*.

#### **3.3.2.2. Cloning chitinase gene into pMYV719/Asy vector**

PCR amplification and restriction digestion using *XbaI* and *SacI* confirmed the presence of chitinase genes in the pNHL20 vector group including pNHL20.1 (*Chi42*), pNHL20.2 (*syncodChi42-1*), pNHL20.2 (*syncodChi42-2*).

### **3.3.3. *A. tumefaciens* LBA4404 carrying chitinase gene**

PCR amplification and restriction digestion confirmed that some *Agrobacterium* colonies had been conjugated with the pNHL19 and pNHL20 plant expression vectors

## **3.4. Transient expression of chitinase genes in *N. benthamiana***

### **3.4.1. Transient expression of chitinase genes in *N. benthamiana***

The two optimized chitinase genes were more suitable for plant expression than the wild-type *Chi42* gene, especially the

*syncodChi42-2* gene which showed significantly higher expression levels on Western blot.

#### **3.4.2. Chitinolytic activity of Ta-CHI42**

Two synthetic *chi42* genes showed higher chitinolytic activities when agroinfiltrated into leaves of *N. benthamiana* along with pMYV508 vector.

#### **3.4.3. In vitro assay for the antifungal activity of Ta-CHI42**

The antifungal activity of Ta-CHI42-1 and Ta-CHI42-2 from *N. benthamiana* coinfiltrated by two vectors, pNHL19.1 and pNHL19.2 with pMYV508, after seven days of treatment is shown in Table 3.8. The growth of *S. rolfisii* causing white mold wilt disease was inhibited on medium containing Ta-CHI42.

#### **3.5. Influence of various factors on the efficiency of chitinase gene transfer into peanuts through *A. tumefaciens*- mediated**

The research conducted for this thesis determined the appropriate conditions for chitinase gene transfer into the embryonated cotyledons of peanut cultivar L14, by *A. tumefaciens* LBA4404-mediated. Embryonated cotyledons were pre-cultured for 3 days prior to bacterial infection, then inoculated for 20 minutes at  $OD_{600} = 1.0$ , and co-cultured with bacteria in the dark on medium supplemented with 200  $\mu$ M cefotaxime for 3 days. Transgenic samples were disinfected with 250 mg/L cefotaxime and screened for high conversion efficiency in media containing 100 mg/L kanamycin. Optimizing these factors improved the efficiency of chitinase gene transformation in peanut cultivar L14.

#### **3.6. Chitinase gene transfer into peanuts using *A. tumefaciens* transformation**

##### **3.6.1. Chitinase gene transfer into peanuts**

The results of the transformation are presented in table 3.9. The data in table 3.9 demonstrate that after four weeks of culture on a selective medium supplemented with kanamycin and cefotaxime, 416 regenerative shoots were obtained from three types of chitinase-transformed specimens using the pNHL19 and pNHL20 vectors, with 364 and pNHL20, respectively.



**Table 3.9.** Chitinase transgenic efficiency in various peanut types.

Sample type	Vector	Gene	Number of samples	Number of shoot regeneration samples	Number of shoot/sample	Number of surviving shoots	Number of shoots with positive PCR
Embryonal cotyledon	pNHL19	<i>Chi42</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>Chi42</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
De-embryonal cotyledon	pNHL19	<i>Chi42</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>Chi42</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
Cotyledon node	pNHL19	<i>Chi42</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>Chi42</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

### 3.6.2. Screening of transgenic peanuts by PCR

PCR amplification was used to confirm the presence of chitinase genes in the peanut genome in all regenerated shoots that survived on the selective medium (Table 3.9). In embryonal cotyledons, for pNHL19 vector, it was 25.8% (*Chi42*), 30.4% (*syncodChi42-1*) and 36.8% (*syncodChi42-2*); whereas in the pNHL20 vector, it was 48.5% (*Chi42*), 52.7% (*syncodChi42-1*) and 40% (*syncodChi42-2*). In the cotyledon nodes, for vector pNHL19, it was 18.2% (*Chi42*), 22.2% (*syncodChi42-1*) and 31.4% (*syncodChi42-2*); whereas in the pNHL20 vector, it was 26.3% (*Chi42*), 38.5% (*syncodChi42-1*) and 36.1% (*syncodChi42-2*). Among the de-embryonal cotyledon samples, those transformed with the pNHL20 vector showed the highest percentage of PCR-positive regenerated shoots: 54.5% (*Chi42*), 61.1% (*syncodChi42-1*), and 55.6% (*syncodChi42-2*). In contrast, no amplicons were found in shoots regenerated from de-embryonal cotyledons with the pNHL19 vector .

### **3.6.3. Expression of chitinase genes in peanuts**

Western blot analyses were performed on transgenic peanut lines that had the visible 42 kDa protein band on SDS-PAGE. Except for the non-transgenic negative control, the majority of tested transgenic peanut lines and positive control showed an antigen-antibody interaction signal in the blot. Among the transgenic peanut lines using the pNHL20 vector, the S2A-12 line (*syncodChi42-2*) exhibited the strongest signal, while the S1A-15 line (*syncodChi42-1*) and the WTA-2 line (*Chi42*) displayed weaker signals.

### **3.6.4. Chitinolytic activity of chitinase**

In the majority of cases, the optimized genes *syncodChi42-1* and *syncodChi42-2* demonstrated stronger expression than the wild-type *Chi42* gene.

### **3.6.5. Antifungal activity of transgenic peanuts**

On a medium containing chitinase transgenic peanut roots, the growth of *S. rolf sii*, which causes white mold wilt disease, was significantly inhibited after 96 h of treatment.

The resistance to *S. rolf sii* of 42 kDa chitinase transgenic peanut lines grown *in vivo* was assessed on a 1-5 scale, as shown in table 3.10. The transgenic peanut lines varied from 1 to 1.67, whereas the controls were between 4.3 and 5.3. Which, the individuals in 3 lines containing the *syncodChi42-2* gene were 100% healthy, while some individuals in transgenic lines with the *syncodChi42-1* gene and the *Chi42* gene had lesions on the stem but they still grew normally.

## **3.7. Physiological and biochemical characteristics of *in vivo* transgenic peanut**

### **3.7.1. Select suitable media**

When transferring *in vitro* transgenic peanuts to soil, the most suitable media was a mixture: soil : sand : vermiculite (1:1:1).

### **3.7.2. Physiological characteristics**

#### **3.7.2.1. Growth of transgenic peanuts**

##### **3.7.2.1.1. Growth time**

The average time from planting to harvesting of transgenic peanut lines is from 122-144 days.

**Table 3.12.** Time of growth and development of chitinase transgenic peanut lines.

Vector	Gene	Transgenic lines	Time (day)				
			Five-leaf	Level 1 branches	Beginning of Flowering	End of flowers	Harvest
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	
Non-transgenic control		NC-1	15	20	43	64	122
		NC-2	20	30	58	77	145

### 3.7.2.1.2. Plant height

Plant height did not show any statistical deviation at five-leaf stage. There was a rapid increase in plant height from the stage of 5 leaves to flowering, and there were variations observed among the transgenic peanut lines.

**Table 3.13.** Plant height of transgenic peanut lines (cm) during the study period

Vector	Gene	Transgenic lines	Plant height (cm)			
			Five-leaf	Full-bloom	End of flowers	Harvest
pNHL19	<i>syncodChi42-2</i>	S2-2	10,6 <sup>a</sup>	17,8 <sup>de</sup>	20,8 <sup>d</sup>	29,3 <sup>c</sup>
		S2-4	9,8 <sup>ab</sup>	17,8 <sup>de</sup>	23,0 <sup>bc</sup>	30,0 <sup>bc</sup>
		S2-6	10,6 <sup>a</sup>	17,6 <sup>de</sup>	23,0 <sup>bc</sup>	29,8 <sup>c</sup>
	<i>syncodChi42-1</i>	S1-1	10,6 <sup>a</sup>	17,4 <sup>e</sup>	20,6 <sup>b</sup>	28,1 <sup>cd</sup>
		S1-2	9,9 <sup>ab</sup>	16,8 <sup>f</sup>	21,8 <sup>cd</sup>	27,9 <sup>d</sup>
		S1-3	9,3 <sup>b</sup>	17,4 <sup>e</sup>	20,5 <sup>d</sup>	29,0 <sup>c</sup>
	<i>Chi42</i>	WT-1	9,7 <sup>ab</sup>	15,9 <sup>fg</sup>	20,6 <sup>d</sup>	26,1 <sup>e</sup>
		WT-2	10,0 <sup>ab</sup>	15,9 <sup>fg</sup>	20,4 <sup>d</sup>	26,0 <sup>e</sup>
		WT-3	9,6 <sup>ab</sup>	15,8 <sup>fg</sup>	20,8 <sup>d</sup>	26,8 <sup>de</sup>
pNHL20	<i>syncodChi42-2</i>	S2A-12	10,1 <sup>ab</sup>	22,0 <sup>a</sup>	25,2 <sup>a</sup>	33,0 <sup>a</sup>
		S2A-13	10,0 <sup>ab</sup>	20,0 <sup>bc</sup>	24,6 <sup>ab</sup>	31,6 <sup>ab</sup>

	S2A-14	10,1 <sup>ab</sup>	21,2 <sup>ab</sup>	24,6 <sup>ab</sup>	32,8 <sup>a</sup>
<i>syncodChi42-1</i>	S1A-9	9,6 <sup>ab</sup>	18,4 <sup>de</sup>	21,6 <sup>cd</sup>	29,6 <sup>c</sup>
	S1A-15	9,8 <sup>ab</sup>	19,6 <sup>c</sup>	23,6 <sup>ab</sup>	29,3 <sup>c</sup>
<i>Chi42</i>	WTA-2	9,6 <sup>ab</sup>	16,8 <sup>f</sup>	21,4 <sup>cd</sup>	29,7 <sup>c</sup>
	WTA-4	9,1 <sup>b</sup>	18,4 <sup>de</sup>	22,2 <sup>cd</sup>	28,8 <sup>c</sup>
Non-transgenic control*		7,2 <sup>c</sup>	15,0 <sup>lg</sup>	18,2 <sup>e</sup>	24,1 <sup>e</sup>

### 3.7.2.1.3. Number of branches per plant

There weren't any visible changes in the number of level 1 branches and the total number of branches per plant in transgenic peanut lines compared to the untransformed control at full bloom and harvest. At the harvest stage, S2A-12 had the highest total number of branches (6.8), followed by S2A-14 (6.6), three lines of *syncodChi42-2* and WTA-2 (6.4). The remaining lines had a total number of branches ranging from 6-6.2 branches per plant, with the control having the lowest at 5.6.

**Table 3.14.** Number of branches chitinase transgenic peanut lines

Vector	Gene	Transgenic lines	Number of level 1 branches/plant		Number of level 1 branches/plant	
			Full-bloom	Harvest	Full-bloom	Harvest
pNHL19	<i>syncodChi42-2</i>	S2-2	3,4 <sup>ab</sup>	4,6 <sup>a</sup>	4,8 <sup>ab</sup>	6,4 <sup>a</sup>
		S2-4	3,6 <sup>a</sup>	4,8 <sup>a</sup>	5,0 <sup>a</sup>	6,4 <sup>a</sup>
		S2-6	3,4 <sup>ab</sup>	4,8 <sup>a</sup>	4,8 <sup>ab</sup>	6,4 <sup>a</sup>
	<i>syncodChi42-1</i>	S1-1	3,4 <sup>ab</sup>	4,6 <sup>a</sup>	4,8 <sup>ab</sup>	6,0 <sup>ab</sup>
		S1-2	3,6 <sup>a</sup>	4,4 <sup>a</sup>	5,0 <sup>a</sup>	6,2 <sup>ab</sup>
		S1-3	3,2 <sup>ab</sup>	4,4 <sup>a</sup>	4,8 <sup>ab</sup>	6,4 <sup>a</sup>
	<i>Chi42</i>	WT-1	3,2 <sup>ab</sup>	4,4 <sup>a</sup>	4,8 <sup>ab</sup>	6,0 <sup>ab</sup>
		WT-2	3,2 <sup>ab</sup>	4,4 <sup>a</sup>	5,0 <sup>a</sup>	6,2 <sup>ab</sup>
		WT-3	3,6 <sup>a</sup>	4,6 <sup>a</sup>	4,8 <sup>ab</sup>	6,2 <sup>ab</sup>
pNHL20	<i>syncodChi42-2</i>	S2A-12	3,6 <sup>a</sup>	4,8 <sup>a</sup>	5,0 <sup>a</sup>	6,8 <sup>a</sup>
		S2A-13	3,6 <sup>a</sup>	4,6 <sup>a</sup>	5,0 <sup>a</sup>	6,2 <sup>ab</sup>
		S2A-14	3,4 <sup>ab</sup>	4,8 <sup>a</sup>	5,0 <sup>a</sup>	6,6 <sup>a</sup>
	<i>syncodChi42-1</i>	S1A-9	3,2 <sup>ab</sup>	4,4 <sup>a</sup>	5,0 <sup>a</sup>	6,0 <sup>b</sup>
		S1A-15	3,4 <sup>ab</sup>	4,4 <sup>a</sup>	5,0 <sup>a</sup>	6,2 <sup>ab</sup>
	<i>Chi42</i>	WTA-2	3,6 <sup>a</sup>	4,4 <sup>a</sup>	5,0 <sup>a</sup>	6,4 <sup>ab</sup>
		WTA-4	3,2 <sup>ab</sup>	4,6 <sup>a</sup>	5,0 <sup>a</sup>	6,2 <sup>ab</sup>
Non-transgenic control			2,8 <sup>b</sup>	3,4 <sup>b</sup>	4,4 <sup>b</sup>	5,6 <sup>b</sup>

### 3.7.2.1.4. Number of compound leaves

The number of compound leaves per plant in the transgenic peanut lines was higher than that of the control, although there was little variation in the number of compound leaves among the transgenic peanut lines.

**Table 3.15.** Number of compound leaves of chitinase transgenic peanut lines

Vector	Gene	Transgenic lines	Number of compound leaves/plant			
			Start of flowering	Full-bloom	End of flowering	Harvest
pNHL19	<i>syncodChi42-2</i>	S2-2	12,4 <sup>ab</sup>	15,2 <sup>cd</sup>	17,2 <sup>bc</sup>	21,2 <sup>b</sup>
		S2-4	12,8 <sup>ab</sup>	15,8 <sup>ab</sup>	17,8 <sup>a</sup>	21,8 <sup>ab</sup>
		S2-6	12,6 <sup>ab</sup>	15,6 <sup>b</sup>	17,6 <sup>ab</sup>	21,6 <sup>ab</sup>
	<i>syncodChi42-1</i>	S1-1	12,4 <sup>ab</sup>	15,4 <sup>bc</sup>	17,4 <sup>b</sup>	21,4 <sup>ab</sup>
		S1-2	12,4 <sup>ab</sup>	15,4 <sup>bc</sup>	17,4 <sup>b</sup>	21,4 <sup>ab</sup>
		S1-3	12,4 <sup>ab</sup>	15,6 <sup>b</sup>	17,6 <sup>ab</sup>	21,6 <sup>ab</sup>
	<i>Chi42</i>	WT-1	11,0 <sup>c</sup>	14,4 <sup>d</sup>	16,4 <sup>cd</sup>	20,0 <sup>de</sup>
		WT-2	10,8 <sup>c</sup>	14,6 <sup>cd</sup>	16,4 <sup>cd</sup>	20,0 <sup>de</sup>
		WT-3	11,2 <sup>c</sup>	14,6 <sup>cd</sup>	16,4 <sup>cd</sup>	20,2 <sup>cd</sup>
pNHL20	<i>syncodChi42-2</i>	S2A-12	13,0 <sup>a</sup>	16,6 <sup>a</sup>	18,4 <sup>a</sup>	22,2 <sup>a</sup>
		S2A-13	12,8 <sup>ab</sup>	15,8 <sup>ab</sup>	18,0 <sup>a</sup>	22,0 <sup>ab</sup>
		S2A-14	13,0 <sup>a</sup>	15,8 <sup>ab</sup>	18,2 <sup>a</sup>	22,2 <sup>a</sup>
	<i>syncodChi42-1</i>	S1A-9	12,0 <sup>b</sup>	15,4 <sup>bc</sup>	16,8 <sup>bc</sup>	20,8 <sup>cd</sup>
		S1A-15	12,8 <sup>ab</sup>	15,4 <sup>bc</sup>	17,0 <sup>bc</sup>	21,0 <sup>c</sup>
	<i>Chi42</i>	WTA-2	12,8 <sup>ab</sup>	15,8 <sup>ab</sup>	17,8 <sup>a</sup>	21,8 <sup>ab</sup>
		WTA-4	12,0 <sup>b</sup>	14,8 <sup>cd</sup>	17,0 <sup>bc</sup>	20,8 <sup>cd</sup>
Non-transgenic control			9,8 <sup>d</sup>	13,0 <sup>e</sup>	15,6 <sup>d</sup>	19,2 <sup>e</sup>

### 3.7.2.2. Intensity of evapotranspiration

The transpiration intensity in the leaves of the transgenic peanut lines was higher than that of the non-transgenic control at all growth stages. Among them, the *syncodChi42-2* transgenic peanut lines, controlled by the root-specific *Asy* promoter, exhibited the highest transpiration intensity during the flowering period.

**Table 3.16.** Intensity of evapotranspiration in the leaves

Vector	Gene	Transgenic lines	Intensity of evapotranspiration (mg/dm <sup>2</sup> /h)		
			Five-leaf	Full-bloom	Pod-filling
pNHL19	<i>syncodChi42-2</i>	S2-2	0,30 <sup>de</sup>	1,15 <sup>cd</sup>	0,56 <sup>fg</sup>
		S2-4	0,68 <sup>a</sup>	1,24 <sup>bc</sup>	0,55 <sup>fg</sup>
		S2-6	0,31 <sup>de</sup>	1,24 <sup>bc</sup>	0,62 <sup>ef</sup>
	<i>syncodChi42-1</i>	S1-1	0,29 <sup>de</sup>	1,24 <sup>bc</sup>	0,69 <sup>cd</sup>
		S1-2	0,28 <sup>de</sup>	1,12 <sup>cd</sup>	0,65 <sup>d</sup>
		S1-3	0,29 <sup>de</sup>	1,28 <sup>b</sup>	0,64 <sup>de</sup>
	<i>Chi42</i>	WT-1	0,24 <sup>de</sup>	1,11 <sup>cd</sup>	0,74 <sup>c</sup>
		WT-2	0,36 <sup>de</sup>	1,10 <sup>cd</sup>	0,66 <sup>d</sup>
		WT-3	0,41 <sup>cd</sup>	1,02 <sup>d</sup>	0,78 <sup>c</sup>
pNHL20	<i>syncodChi42-2</i>	S2A-12	0,74 <sup>a</sup>	1,46 <sup>a</sup>	0,99 <sup>a</sup>

	S2A-13	0,62 <sup>a</sup>	1,38 <sup>ab</sup>	0,92 <sup>ab</sup>
	S2A-14	0,49 <sup>bc</sup>	1,46 <sup>a</sup>	0,91 <sup>ab</sup>
<i>syncodChi42-1</i>	S1A-9	0,48 <sup>bc</sup>	1,14 <sup>cd</sup>	0,98 <sup>a</sup>
	S1A-15	0,41 <sup>cd</sup>	1,35 <sup>ab</sup>	0,86 <sup>b</sup>
<i>Chi42</i>	WTA-2	0,36 <sup>de</sup>	1,27 <sup>bc</sup>	0,51 <sup>ef</sup>
	WTA-4	0,28 <sup>de</sup>	1,12 <sup>cd</sup>	0,56 <sup>fg</sup>
Non-transgenic control		0,21 <sup>e</sup>	0,10 <sup>d</sup>	0,50 <sup>g</sup>

### 3.7.2.3. Chlorophyll content

The Chla and Chlb content in the leaves of chitinase transgenic peanut lines gradually increased from the pre-flowering period (five-leaf) to flowering, reaching its peak during full-bloom.

**Table 3.17.** Chlorophyll content of chitinase transgenic peanut lines.

Vector	Gene	Transgenic lines	Total Chl (mg/g)					
			Five-leaf		Full-bloom		Pod-filling	
			Chla	Chlb	Chla	Chlb	Chla	Chlb
pNHL19	<i>syncodChi42-2</i>	S2-2	0,22 <sup>c</sup>	0,90 <sup>f</sup>	0,50 <sup>b</sup>	1,09 <sup>e</sup>	0,37 <sup>c</sup>	0,85 <sup>c</sup>
		S2-4	0,23 <sup>b</sup>	0,95 <sup>de</sup>	0,52 <sup>a</sup>	1,20 <sup>b</sup>	0,41 <sup>b</sup>	1,06 <sup>b</sup>
		S2-6	0,23 <sup>b</sup>	0,93 <sup>e</sup>	0,54 <sup>a</sup>	1,12 <sup>d</sup>	0,38 <sup>c</sup>	0,93 <sup>c</sup>
	<i>syncodChi42-1</i>	S1-1	0,19 <sup>d</sup>	0,89 <sup>f</sup>	0,49 <sup>b</sup>	1,07 <sup>e</sup>	0,35 <sup>d</sup>	0,87 <sup>e</sup>
		S1-2	0,20 <sup>d</sup>	0,89 <sup>f</sup>	0,50 <sup>b</sup>	1,08 <sup>e</sup>	0,36 <sup>d</sup>	0,87 <sup>e</sup>
		S1-3	0,20 <sup>d</sup>	0,889 <sup>f</sup>	0,50 <sup>b</sup>	1,08 <sup>e</sup>	0,36 <sup>d</sup>	0,87 <sup>e</sup>
	<i>Chi42</i>	WT-1	0,18 <sup>d</sup>	0,90 <sup>f</sup>	0,51 <sup>b</sup>	1,05 <sup>e</sup>	0,40 <sup>b</sup>	0,86 <sup>e</sup>
		WT-2	0,19 <sup>d</sup>	0,89 <sup>f</sup>	0,51 <sup>b</sup>	1,05 <sup>e</sup>	0,39 <sup>c</sup>	0,85 <sup>e</sup>
		WT-3	0,19 <sup>d</sup>	0,89 <sup>f</sup>	0,49 <sup>b</sup>	1,08 <sup>e</sup>	0,35 <sup>d</sup>	0,87 <sup>e</sup>
pNHL20	<i>syncodChi42-2</i>	S2A-12	0,24 <sup>a</sup>	1,10 <sup>a</sup>	0,54 <sup>a</sup>	1,29 <sup>a</sup>	0,49 <sup>a</sup>	1,09 <sup>a</sup>
		S2A-13	0,23 <sup>b</sup>	1,01 <sup>b</sup>	0,54 <sup>a</sup>	1,17 <sup>c</sup>	0,45 <sup>a</sup>	1,07 <sup>b</sup>
		S2A-14	0,23 <sup>b</sup>	1,04 <sup>b</sup>	0,54 <sup>a</sup>	1,23 <sup>b</sup>	0,48 <sup>a</sup>	1,04 <sup>b</sup>
	<i>syncodChi42-1</i>	S1A-9	0,20 <sup>d</sup>	0,98 <sup>c</sup>	0,50 <sup>b</sup>	1,14 <sup>d</sup>	0,38 <sup>c</sup>	1,01 <sup>c</sup>
		S1A-15	0,22 <sup>c</sup>	1,01 <sup>b</sup>	0,53 <sup>a</sup>	1,19 <sup>c</sup>	0,45 <sup>a</sup>	0,99 <sup>c</sup>
	<i>Chi42</i>	WTA-2	0,22 <sup>b</sup>	0,93 <sup>c</sup>	0,54 <sup>a</sup>	1,12 <sup>d</sup>	0,38 <sup>c</sup>	0,83 <sup>e</sup>
WTA-4		0,21 <sup>c</sup>	0,98 <sup>c</sup>	0,51 <sup>b</sup>	1,17 <sup>c</sup>	0,39 <sup>c</sup>	1,02 <sup>c</sup>	
Non-transgenic control		0,15 <sup>e</sup>	0,86 <sup>f</sup>	0,45 <sup>c</sup>	0,98 <sup>f</sup>	0,33 <sup>d</sup>	0,73 <sup>f</sup>	

### 3.7.2.4. Peanut yield components

*Number of flowers/plant:* The total number of flowers per plant in the transgenic peanut lines ranged from 24.6 to 28.0, which was higher than that of the non-transgenic control. Among them, the line S2A-12 was found to have the highest number of flowers.

*Ratio of effective flower:* Overall, there was no significant difference in the ratio of effective flowers among the peanut lines, which ranged from 31.2% to 37.8%.

*Number of mature pods/plant:* The number of mature pods per plant was higher in the transgenic peanut lines than in the non-transgenic control, ranging from 7.9% to 39.5%.

*Weight of 100 pods:* There was little statistical difference in the weight of 100 pods among the transgenic peanut lines, but it was 4.1% to 11.4% higher compared to the non-transgenic control line.

*Weight of 100 seeds:* The weight of 100 seeds from 18 transgenic peanut lines ranged from 33.06 g to 38.74 g, which was higher than that of the non-transgenic control line (31.76 g).

**Table 3.18.** Primary components determining peanut yields.

Vector	Gene	Transgenic lines	Number of flowers/plant	Ratio of effective flower (%)	Number of mature pods/plant	Weight of 100 pods (g)	Weight of 100 seeds (g)	
pNHL19	<i>syncodChi42-2</i>	S2-2	25,6 <sup>cd</sup>	33,6 <sup>b</sup>	8,6 <sup>c</sup>	114,84 <sup>bc</sup>	35,22 <sup>cd</sup>	
		S2-4	25,8 <sup>cd</sup>	34,9 <sup>ab</sup>	9,0 <sup>bc</sup>	115,48 <sup>b</sup>	36,22 <sup>c</sup>	
		S2-6	25,8 <sup>cd</sup>	32,5 <sup>b</sup>	8,4 <sup>cd</sup>	115,32 <sup>b</sup>	35,62 <sup>cd</sup>	
	<i>syncodChi42-1</i>	S1-1	25,4 <sup>de</sup>	33,1 <sup>b</sup>	8,4 <sup>cd</sup>	112,58 <sup>bc</sup>	33,66 <sup>ef</sup>	
		S1-2	25,4 <sup>de</sup>	33,0 <sup>b</sup>	8,4 <sup>cd</sup>	114,88 <sup>bc</sup>	34,54 <sup>de</sup>	
		S1-3	25,4 <sup>de</sup>	33,9 <sup>ab</sup>	8,6 <sup>c</sup>	114,70 <sup>bc</sup>	34,54 <sup>de</sup>	
	<i>Chi42</i>	WT-1	24,6 <sup>ef</sup>	35,0 <sup>ab</sup>	8,6 <sup>c</sup>	111,66 <sup>c</sup>	33,06 <sup>fg</sup>	
		WT-2	24,8 <sup>ef</sup>	33,1 <sup>b</sup>	8,2 <sup>d</sup>	111,86 <sup>c</sup>	33,10 <sup>fg</sup>	
		WT-3	24,6 <sup>ef</sup>	34,2 <sup>ab</sup>	8,4 <sup>d</sup>	111,68 <sup>c</sup>	32,28 <sup>gh</sup>	
pNHL20	<i>syncodChi42-2</i>	S2A-12	28,0 <sup>a</sup>	37,8 <sup>a</sup>	10,6 <sup>a</sup>	119,50 <sup>a</sup>	38,74 <sup>a</sup>	
		S2A-13	27,2 <sup>ab</sup>	34,5 <sup>ab</sup>	9,4 <sup>bc</sup>	115,86 <sup>b</sup>	37,92 <sup>ab</sup>	
		S2A-14	27,8 <sup>a</sup>	34,5 <sup>ab</sup>	9,6 <sup>b</sup>	115,86 <sup>b</sup>	37,70 <sup>ab</sup>	
	<i>syncodChi42-1</i>	S1A-9	25,8 <sup>cd</sup>	34,1 <sup>ab</sup>	8,8 <sup>bc</sup>	113,58 <sup>bc</sup>	35,64 <sup>cd</sup>	
		S1A-15	26,6 <sup>bc</sup>	33,8 <sup>ab</sup>	9,0 <sup>bc</sup>	115,52 <sup>b</sup>	36,94 <sup>b</sup>	
	<i>Chi42</i>	WTA-2	25,2 <sup>de</sup>	31,8 <sup>b</sup>	8,0 <sup>d</sup>	113,42 <sup>bc</sup>	33,68 <sup>ef</sup>	
		WTA-4	25,2 <sup>de</sup>	34,1 <sup>ab</sup>	8,6 <sup>c</sup>	114,06 <sup>bc</sup>	35,82 <sup>cd</sup>	
	Non-transgenic control			24,4 <sup>f</sup>	31,2 <sup>b</sup>	7,6 <sup>d</sup>	107,26 <sup>d</sup>	31,76 <sup>h</sup>

### 3.7.3. Major quality characteristics

#### 3.7.3.1. Protein content

The results showed that the protein content of the transgenic peanut lines was quite high, ranging from 23.11 to 26.14 g/100 g, which was higher than that of the non-transgenic control (22.35 g/100 g).

#### 3.7.3.2. Lipid content

The lipid content in 100 g of the chitinase transgenic peanut seeds ranged from 48.26 to 49.15 g, and there was little difference with the non-transgenic control.

### 3.7.3.3. Reducing sugars content

The reducing sugar content in the transgenic peanut lines ranged from 0.92 to 1.10 g/100 g.

**Table 3.19.** Some of the peanut seed's major nutritional quality components.

Vector	Gene	Transgenic lines	Protein (g/100g)	Lipid (g/100g)	Reducing sugar (g/100g)
pNHL19	<i>syncodChi42-2</i>	S2-2	23,86 <sup>a</sup>	48,85 <sup>ab</sup>	0,96 <sup>a</sup>
		S2-4	23,45 <sup>a</sup>	48,57 <sup>ab</sup>	0,99 <sup>a</sup>
		S2-6	25,91 <sup>a</sup>	48,61 <sup>ab</sup>	1,10 <sup>a</sup>
	<i>syncodChi42-1</i>	S1-1	24,58 <sup>a</sup>	48,47 <sup>ab</sup>	1,04 <sup>a</sup>
		S1-2	25,76 <sup>a</sup>	48,47 <sup>ab</sup>	0,96 <sup>a</sup>
		S1-3	25,27 <sup>a</sup>	48,67 <sup>ab</sup>	0,93 <sup>a</sup>
	<i>Chi42</i>	WT-1	23,26 <sup>a</sup>	48,26 <sup>b</sup>	0,93 <sup>a</sup>
		WT-2	24,62 <sup>a</sup>	48,26 <sup>b</sup>	1,01 <sup>a</sup>
		WT-3	23,11 <sup>a</sup>	48,32 <sup>b</sup>	0,92 <sup>a</sup>
pNHL20	<i>syncodChi42-2</i>	S2A-12	26,33 <sup>a</sup>	49,15 <sup>a</sup>	1,10 <sup>a</sup>
		S2A-13	25,98 <sup>a</sup>	48,65 <sup>ab</sup>	1,04 <sup>a</sup>
		S2A-14	25,83 <sup>a</sup>	48,57 <sup>ab</sup>	1,01 <sup>a</sup>
	<i>syncodChi42-1</i>	S1A-9	24,96 <sup>a</sup>	48,43 <sup>ab</sup>	0,97 <sup>a</sup>
		S1A-15	25,75 <sup>ab</sup>	49,05 <sup>a</sup>	1,00 <sup>a</sup>
	<i>Chi42</i>	WTA-2	24,47 <sup>c</sup>	48,36 <sup>b</sup>	0,94 <sup>a</sup>
		WTA-4	23,33 <sup>a</sup>	48,39 <sup>b</sup>	0,97 <sup>a</sup>
Non-transgenic control			22,35 <sup>d</sup>	47,53 <sup>b</sup>	0,95 <sup>a</sup>



## CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS

### 1. CONCLUSIONS

1. The *in vitro* regeneration protocol of peanut cultivar L14 has been optimized as follows: Peanuts are sterilized using 65% NaOCl for 10 minutes, then the seeds are peeled and split to germinate. Shoot regeneration from various types of explants and shoot multiplication on MS medium containing 4 mg/L BAP and 0.1 mg/L NAA, rooting of individual shoots on MS medium containing 0.5 mg/L NAA.

2. Optimized the nucleotide sequence of the wild-type gene *Chi42* encoding 42 kDa chitinase from *T. asperellum* SH16 for the plant expression. Two sequences have been optimized for the codon usage in plant expression and were registered on GenBank with codes MT083802.1 (*syncodChi42-1*) and MT083803.1 (*syncodChi42-2*). The chitinase genes (*Chi42*, *syncodChi42-1*, and *syncodChi42-2*) with root-specific *Asy* promoter or constitutive promoter *dp35S* were successfully cloned in plant expression vectors.

3. Successfully expressed and purified 42 kDa chitinase in *E. coli*. Simultaneously, this enzyme was used to successfully produce polyclonal antibody against 42 kDa chitinase in mice and can be used for analyzing Western blot.

4. The wild-type chitinase gene (*Chi42*) from *T. asperellum* SH16, as well as two optimized chitinase genes (*syncodChi41-1* and *syncodChi41-2*), were successfully transiently expressed in *N. benthamiana*. Enzymes produced from the two optimized chitinase genes exhibited higher chitinolytic activity than compared to those from the wild-type chitinase gene.

5. The factors that are appropriate for transferring the chitinase gene into peanut cultivar L14 through *A. tumefaciens* LBA4404 were identified as follows: Explants were pre-cultured for three days before bacterial inoculation. They were then inoculated for 20 minutes at  $OD_{600} = 1.0$  and co-cultured with bacteria for three days in the dark on a medium supplemented with 200  $\mu$ M acetosyringone. The transgenic samples were disinfected with cefotaxime 250 mg/L and screened on medium containing kanamycin 100 mg/L.

6. Three chitinase genes (*Chi42*, *syncodChi42-1*, and *syncodChi42-2*) were successfully transformed into peanut cultivar

L14 using plant expression vectors pNHL19 and pNHL20, resulting in the creation of 16 chitinase transgenic peanut lines in the T<sub>0</sub> generation. The transgenic peanut lines were assessed using PCR, Western blot, chitinase activity, and resistance to *S. rolfisii* under *in vitro* and *in vivo* conditions. The optimized genes *syncodChi42-1* and *syncodChi42-2* exhibited stronger expression than the wild-type *Chi42* gene. All the transgenic peanut lines demonstrated low disease ratings when treated with *S. rolfisii* under *in vivo* conditions, ranging from 1 to 1.67, while the control ranged from 4.33 to 5.0.

7. The appropriate substrate for transplanting the transgenic peanut lines from *in vitro* to soil has been identified as a mixture of soil, sand, and vermiculite (1:1:1). The growth time of the transgenic peanut lines was 133-144 days under net house conditions. The physiological and biochemical parameters of the 16 transgenic peanut lines were similar or slightly higher than those of the non-transgenic control.

## **2. RECOMMENDATIONS**

1. Further evaluation is being carried out to determine the ability of chitinase-transgenic peanut lines to against phytopathogenic fungi, which have cell walls containing chitin.

2. Chitinase-transgenic peanut lines can serve as valuable materials for peanut variety selection. Further analysis in subsequent generations is required to select and develop a peanut line that exhibits high resistance to fungi and stability.

## PUBLICATIONS RELATED TO THE THESIS

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.
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.
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.
4. **Phung Thi Bich Hoa**, Mai Thi Thu Hien, Nguyen Hoang Tue, Nguyen Thi Kim Co, Nguyen Ty, Nguyen Xuan Huy (2021). Cloning and characteristic prediction of 42 kDa chitinase from *Trichoderma asperellum*. *Hue University Journal of Science: Natural Science*, 130 (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.
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.

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*, pp 1–16.
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.
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*. (Accepted)
10. **Phung Thi Bich Hoa**, Nguyen Hoang Tue, Pham Thi Huyen Trang, Tran Gia Cat Tuong, Huynh Thi Quynh Trang, Nguyen Xuan Huy, Nguyen Hoang Loc (2022). Cloning genes encoding chitinase 42 kDa of *Trichoderma asperellum* into the plant expression vector pMYV719 for genetic transformation. *Hue University Journal of Science: Natural Science*, 131(1C): 55–62.
11. Nguyen Hoang Tue, Luc Hoang Linh, Le Thi Hang, Huynh Thi Quynh Trang, Nguyen Xuan Huy, **Phung Thi Bich Hoa** (2022). Investigation on some factors affecting *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Journal of Science and Technology, Hue University of Sciences*. (Accepted)