IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

1. Kết luận

- Phân hữu cơ vi sinh sản xuất từ rơm rạ sau thu hoạch tại xã Báo Đáp, huyện Trấn Yên, tỉnh Yên Bái có pH trung tính, độ ẩm <30%, hàm lượng chất hữu cơ ≥ 15%, vi sinh vật hữu ích đạt ≥ $1✧10^6$ CFU/g, không độc hại cho cây trồng, động vật và người.

- Hiệu quả bón phân HCVS sản xuất từ rơm rạ cho lúa: i) Giảm được 20% phân hóa học (đạm urê, supe lân, KCl), tiết kiệm chi phí đầu tư phân bón hóa học 1.120.000 đồng/ha, tăng năng suất lúa từ 8,23% đến 8,59% so với đối chứng (bón phân hóa học theo qui trình khuyến nông 92 kg N, 64 kg P_2O_5, 72 kg K_2O/ha, tương đương 200 kg urê, 400 kg supe lân, 120 kg KCl/ha); ii) Lãi thuần là 3.776.000 đồng/ha so với đối chứng ở thí nghiệm ngoài đồng (hè thu năm 2013) và 3.757.000 đồng/ha ở mô hình vụ đông xuân 2014; iii) Nếu tận dụng rơm rạ và công lao động của các hộ gia đình, lãi thuần thu được khoảng 5.900.000 đ/ha; iv) Đảm bảo lợi ích kinh tế, xã hội và môi trường trong giai đoạn hiện nay.

2. Đề nghị

Phổ biến rộng rãi trên các phương tiện thông tin đại chúng việc sử dụng rơm rạ chế biến làm phân hữu cơ vi sinh phục vụ sản xuất nông nghiệp để giảm bón phân hóa học và giảm ô nhiễm môi trường.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Arshad Javaid (2011). Effects of biofertilizers combined with different soil amendments on potted rice plants. *Chilean Journal of Agricultural Research* 71 (1), pp. 157-163.
2. Nguyễn Văn Bộ, Nguyễn Trọng Thi, Bùi Huy Hiền, Nguyễn Văn Chiến (2001). Bón phân cân đối cho cây trồng ở Việt Nam.
3. Lê Văn Nhương (2001). *Công nghệ xử lý một số phế thải nông phẩm chủ yếu*.
4. Lê Thị Thanh Thuỷ và ctv (2009). Nghiên cứu ứng dụng công nghệ vi sinh để xử lý rơm rạ thành mùn hữu cơ. *Hội thảo khoa học về Đất, nước và dinh dưỡng trong hệ thống canh tác Việt Nam. Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội*, tr. 57-64.
5. 10.TCN: 216-2003. Khảo nghiệm hiệu lực phân bón trên đồng ruộng đối với cây trồng.

Ngày nhận bài: 6/10/2015
Người phản biện: PGS. TS. Nguyễn Văn Viết
Ngày phản biện: 10/10/2015
Ngày duyệt đăng: 16/10/2015

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA TỪ TRƯỜNG ĐẾN HIỆU QUẢ CHUYỂN GEN THÔNG QUA VI KHUẨN *Agrobacterium tumefaciens* Ở CÂY NGÔ

Nguyễn Văn Đồng[1], Phạm Thị Lý Thu[1],
Phạm Thị Hương[1],Trần Duy Hưng[1],
Lê Thị Mai Hương[1], Lê Thị Thanh Nga[1], Lê Huy Hàm[1]

The study on effect of magnetic field to the *Agrobacterium* mediated transformation efficiency into maize immature embryos

Abstarct

The magnetic field is a natural component of our environment, influencing all living organisms. In this study, the effects of magnetic field on bacterial growth and *Agrobacterium tumefaciens* mediated gene transfer in maize immature embryos was determined. The bacterial growth in log phase was strongest with intensity of magnetic field 0.14T at Southern as well as Northern pole. To estimate the effect of magnetic field, the explants in petri dishes were exposed to 0.085T and 0.14 T magnetic field for cocultivation and regeneration periods at Southern and Northern pole of magnetic field. The results showed that the intensity of magnetic field at 0.14T has positive effect on the cocultivation stage and the transgenic shoot regeneration stage when compared with control explants. The different poles of the magnetic field does not significantly affect to the gene transformation efficiency into maize immature embryo. The considerable increase of gene transformation efficiency in the formula 0.14T/S was 0.21% whereas this ratio was 0.07% in the control fomula.

***Key words**: Agrobacterium tumefaciens,* maize, transformation, EPSPS, immature embryo.

Viện Di truyền Nông nghiệp.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cây trồng chuyển gen đã và đang được ứng dụng rộng rãi, góp phần đảm bảo an ninh lương thực, phát triển bền vững và thích ứng với biến đổi khí hậu trên toàn cầu. Tính đến năm 2014, diện tích trồng ngô trên thế giới đạt 184 triệu ha, sản lượng đạt 1,018 triệu tấn (FAO, 2014), trong đó diện tích trồng ngô chuyển gen chiếm 30%. Trong số các phương pháp chuyển gen vào thực vật được áp dụng phổ biến thì phương pháp chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* được đánh giá là đơn giản, dễ thực hiện hơn so với các phương pháp khác. Đối với cây ngô, loài thực vật một lá mầm không phải là vật chủ của *Agrobacterium,* có tần số chuyển nạp gen thấp thì việc cải thiện các yếu tố nhằm tăng hiệu quả của quá trình chuyển gen luôn là vấn đề cấp thiết. Các nghiên cứu cải thiện hiệu quả chuyển gen ở ngô hầu hết tập trung vào đánh giá ảnh hưởng của kiểu gen, chủng vi khuẩn, thành phần môi trường lây nhiễm và đồng nuôi cấy... Tuy nhiên, chưa có công bố nào về ảnh hưởng của từ trường tới quá trình chuyển gen vào thực vật.

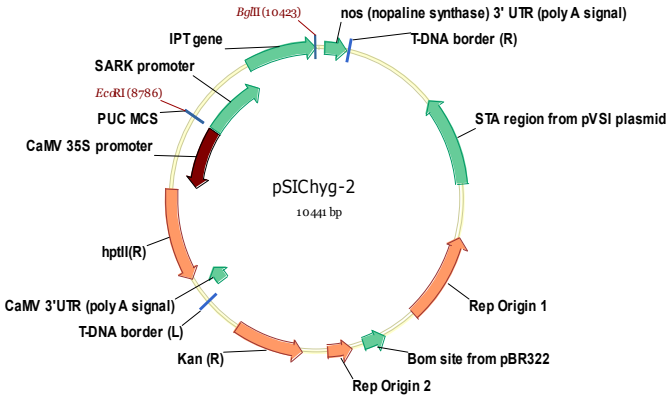
Các nghiên cứu gần đây cho thấy từ trường có tác dụng tích cực tới hệ thống nuôi cấy *in vitro* thông qua kích thích quá trình phân chia, tăng sinh và phân hóa tế bào. Kết quả là tốc độ sinh trưởng của cây tăng lên rõ rệt và tăng tỉ lệ tạo cụm chồi, chồi phát sinh, số rễ tạo thành ở cây thân gỗ *Paulownia* (Atak và cs, 2003; Celik và cs, 2008), các loài hoa lan *Phalaenopsis* (Van và cs, 2011a, b), *Cybidium* và *Spathiphyllum* (Van và cs, 2012a; b), tăng hàm lượng diệp lục trong lá (Atak và cs, 2003; Dhawi và Al-Khayri, 2009; Vân và cs, 2012). Xuất phát từ cơ sở khoa học nêu trên chúng tôi tiến hành nghiên cứu "*Ảnh hưởng của từ trường đến hiệu quả chuyển gen thông qua vi khuẩn Agrobacterium tumefaciens ở cây ngô*".

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

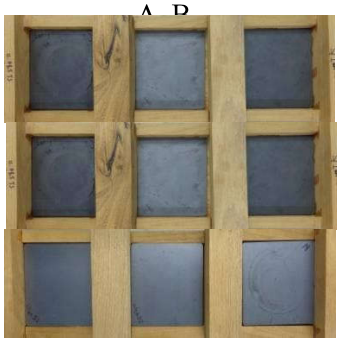
1. Vật liệu nghiên cứu

- Dòng ngô VH1 thuộc tập đoàn ngô của Viện Di truyền Nông nghiệp, được trồng trong nhà lưới cách ly côn trùng, cung cấp nguồn vật liệu phôi non cho các thí nghiệm chuyển gen

- Chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* EHA105 mang vector pSIchyg-2 chứa gen quan tâm *IPT* được điều khiển bởi promoter *SARK* và gen chỉ thị chọn lọc *hpt* (kháng hygromycine) được điều khiển bởi promoter CaMV 35S (hình 1).



Hình 1. Sơ đồ cấu trúc vector chuyển gen pSIChyg-2



Hình 2. Bộ từ trường không đều có cường độ 0,085Tesla (A) và 0,14Tesla (B)

- Hệ thống từ trường không đều được thiết lập bởi các nam châm (do công ty Kinki Magnet Co., Osaka, Nhật Bản cung cấp) có cường độ 0,085 Tesla và 0,14 Tesla được đo bằng Tesla meter TM-701 KANETEC. Nam châm được đặt cố định lên hệ thống giá gỗ (Hình 2). Mỗi bề mặt của nam châm có hai cực: Cực Bắc (N) và cực Nam (S). Thiết kế hệ thống từ trường theo mô tả của Tanaka *et al*., (2010).

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1 Nghiên cứu ảnh hưởng của từ trường lên khả năng sinh trưởng của vi khuẩn A. tumefaciens

Nuôi phục hồi vi khuẩn bằng cách cấy vạch lên đĩa petri chứa môi trường LB agar (10g Bacto-tryptone, 5g yeast extract, 10g NaCl, 20g agar), có bổ sung kanamycin 50 mg/L; rifampicin 25mg/L,

nuôi cấy ở 28^{0}C trong 24 h. Sau đó, chọn khuẩn lạc mọc riêng rẽ cấy chuyển sang 150 ml dung dịch LB lỏng (10g Bacto-tryptone, 5g yeast extract, 10g NaCl), có bổ sung kháng sinh chọn lọc (kanamycin 50mg/ml; rifampicin 25mg/ml), nuôi lắc ở 120v/p, 28^{0}C, 16h. Xác định nồng độ của dung dịch khuẩn thu được bằng cách đo mật độ quang học OD_{600}. Chia đều lượng dịch khuẩn tạo thành vào 3 bình tam giác, mỗi bình chứa 50ml dung dịch khuẩn mới có mật độ tế bào vi khuẩn như nhau. Đặt cả 3 bình vào hệ thống từ trường đã được thiết kế, nuôi lắc 120v/p ở 28^{0}C. Tiến hành xác định khả năng sinh trưởng của tế bào vi khuẩn dưới tác động khác nhau của từ trường sau 0h, 2h, 3h, 4h, 5h, 6h, 7h, 24h, 26h nuôi cấy thông qua giá trị OD_{600} đo được.

2.2 Nghiên cứu ảnh hưởng của từ trường lên khả năng tái sinh của phôi non ngô

Sử dụng kỹ thuật nuôi cấy mô và chuyển gen vào phôi ngô non theo quy trình của Phạm Thị Lý Thu (2007). Phôi non được tách từ các bắp ngô ở giai đoạn 18-20 ngày sau thụ phấn. Phôi non sau khi tách được lây nhiễm, đồng nuôi cấy với dịch vi khuẩn *Agrobacterium* EHA105 mang gen *IPT*. Mẫu thí nghiệm giai đoạn đồng nuôi cấy, tái sinh chồi được đặt trên hệ thống từ trường không đều,trong tủ nuôi điều khiển nhiệt độ với thời gian chiếu sáng 8-10 giờ/ngày, cường độ chiếu sáng 1200-1600 lux, nhiệt độ 26^{0}C±2, thời gian từ 7-10 ngày.

2.3 Phương pháp phân tích sinh học phân tử cây chuyển gen

- Tách DNA tổng số:

Tách chiết DNA tổng số từ mẫu lá của các cây ngô chuyển gen tái sinh theo phương pháp CTAB (Saghai-Maroof, 1984) có cải tiến. Kiểm tra nồng độ và độ tinh sạch của DNA tổng số bằng máy quang phổ nanodrop và điện di trên gel agarose 1%.

- Phân tích PCR

Phân tích PCR tiến hành với cặp mồi IPT-F/IPT-R đặc hiệu cho gen *IPT* thành phần PCR được bổ sung theo hướng dẫn của Kit Thermo. Chương trình phản ứng với cặp mồi IPT-F/IPT-R: 94^{o}C/3 phút, 94^{o}C/30 giây, 59^{o}C/30 giây, 72^{o}C/45 giây, lặp lại trong 35 chu kì, 72^{o}C/5 phút, kết thúc 4^{o}C.

Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1% ở hiệu điện thế 100 mV và nhuộm bằng ethidium bromide để quan sát các băng DNA.

Bảng 1. Trình tự đoạn mồi sử dụng trong nghiên cứu

TT	Tên mồi	Trình tự mồi
1	IPT-F	5'- GGTCATTGGCTTAGGGTTC-3'
2	IPT-R	5'- GTCATCCGTTCGGAATGTATTAG-3'

3. Các chỉ tiêu theo dõi và đánh giá

Tỷ lệ phục hồi của phôi ngô sau biến nạp (%) = Số phôi sống sót sau chuyển gen × 100/Tổng số phôi biến nạp; Tỷ lệ tạo mô sẹo chuyển gen (%) = Số mô sẹo chuyển gen tạo thành × 100/Tổng số phôi phục hồi sau biến nạp; Tỷ lệ tái sinh cây chuyển gen (%) = Số cây chuyển gen tái sinh × 100/Tổng số mô sẹo chuyển gen phôi hóa; Tần số chuyển gen giả định (%) = Số cây đưa ra đất × 100/Tổng số phôi biến nạp; Hiệu suất biến nạp gen (%) = số cây đưa ra đất hữu thụ và dương tính với PCR × 100/Tổng số phôi biến nạp.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Ảnh hưởng của từ trường lên khả năng sinh trưởng của vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*

Số liệu thu được trong các thí nghiệm về ảnh hưởng của từ trường cực Nam và cực Bắc lên quá trình sinh trưởng của vi khuẩn *A. tumefaciens* cho thấy cường độ của từ trường có ảnh hưởng tích cực nhưng cực của từ trường thì không ảnh hưởng nhiều tới sự sinh trưởng của vi khuẩn.

Bảng 2. Ảnh hưởng của từ trường đến sự sinh trưởng và phát triển của *A. tumefaciens*

TT	TGST (h)	Cường độ từ trường					
		Cực Bắc			Cực Nam		
		0T/N	0,14T/N	0,085T/N	0T/S	0,14T/S	0,085T/S
1	0h	0,024±0,005	0,024±0,005	0,024±0,005	0,031±0,001	0,031±0,001	0,031±0,001
2	2h	0,063±0,003	0,079±0,004	0,074±0,001	0,067±0,002	0,069±0,001	0,065±0,002
3	3h	0,101±0,004	0,115±0,007	0,108±0,002	0,113±0,003	0,122±0,002	0,116±0,002
4	4h	0,173±0,009	0,168±0,004	0,187±0,011	0,282±0,006	0,295±0,002	0,290±0,001
5	5h	0,242±0,002	0,252±0,002	0,244±0,000	0,404±0,001	0,422±0,001	0,407±0,001
6	6h	0,387±0,003	0,403±0,009	0,396±0,010	0,550±0,004	0,564±0,001	0,562±0,007
7	7h	0,555±0,006	0,634±0,059	0,567±0,009	0,791±0,001	0,794±0,001	0,809±0,002
8	24h	1,109±0,000	1,156±0,003	1,448±0,001	1,118±0,001	1,168±0,001	1,108±0,003
9	26h	1,112±0,003	1,162±0,002	1,458±0,006	1,124±0,002	1,170±0,002	1,111±0,001

Ghi chú: T: Tesla; N: Cực Bắc; S: Cực Nam; TGST: Thời gian sinh trưởng của vi khuẩn

Ở pha lag và giai đoạn đầu của pha log, sự sinh trưởng của vi khuẩn khác biệt không đáng kể ở các cường độ từ trường khác nhau trên cả hai cực Nam, Bắc của thanh nam châm. Cuối pha log, vi khuẩn sinh trưởng mạnh nhất ở cường độ từ trường 0,14T so với các công thức từ trường khác trên cả 2 cực của từ trường.

Nhìn chung ảnh hưởng của từ trường không đều còn khá phức tạp, cần những nghiên cứu sâu hơn về tác động của từ trường lên màng tế bào cũng như ảnh hưởng đến sự phân bố các ion trong tế bào thông qua các kênh dẫn truyền ion.

2. Ảnh hưởng của từ trường tới hiệu quả chuyển gen vào phôi non ngô

5 thí nghiệm chuyển gen *IPT* vào dòng ngô VH1 được thực hiện và kết quả thí nghiệm được trình bày tại bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của từ trường tới hiệu quả chuyển gen vào phôi non ngô

STT	Cường độ từ trường	CCM	ReM	EcM	SeM	RM	Tỉ lệ mẫu phục hồi (%)	Tỉ lệ tạo mô sẹo (5)	Tỉ lệ tái sinh chồi (%)	Số cây ra đất	Số cây sống sót
1	0,085T/N	1819	1320	754	330	87	72,57	57,12	43,77	29	6
2	0,085T/S	1699	1341	770	373	123	78,93	57,42	48,44	23	11
3	0,14T/N	1685	731	386	264	153	43,38	52,80	68,39	66	30
4	0,14T/S	1451	701	376	330	108	48,31	53,64	87,77	9	6
5	ĐC	1527	799	433	136	34	52,32	54,19	31,41	5	2
	Tổng số									132	55

Kết quả trên bảng 3 cho thấy tỉ lệ mẫu phục hồi khác biệt rõ rệt giữa hai công thức từ trường và so với công thức đối chứng. Tỉ lệ mẫu phục hồi tại công thức 0,085T khá cao (72,57-78,93%), trong khi đó, tại công thức 0,14T, tỉ lệ này đạt 43,38-48,31%. Tại công thức từ trường 0,14T, sinh trưởng của vi khuẩn là mạnh nhất. Ở giai đoạn đồng nuôi cấy, mẫu chuyển gen được đồng nuôi cấy với vi khuẩn chịu ảnh hưởng của từ trường. Sự phát triển mạnh của vi khuẩn sẽ làm cho sức sống của phôi yếu do đó tỉ lệ mẫu phục hồi giảm.

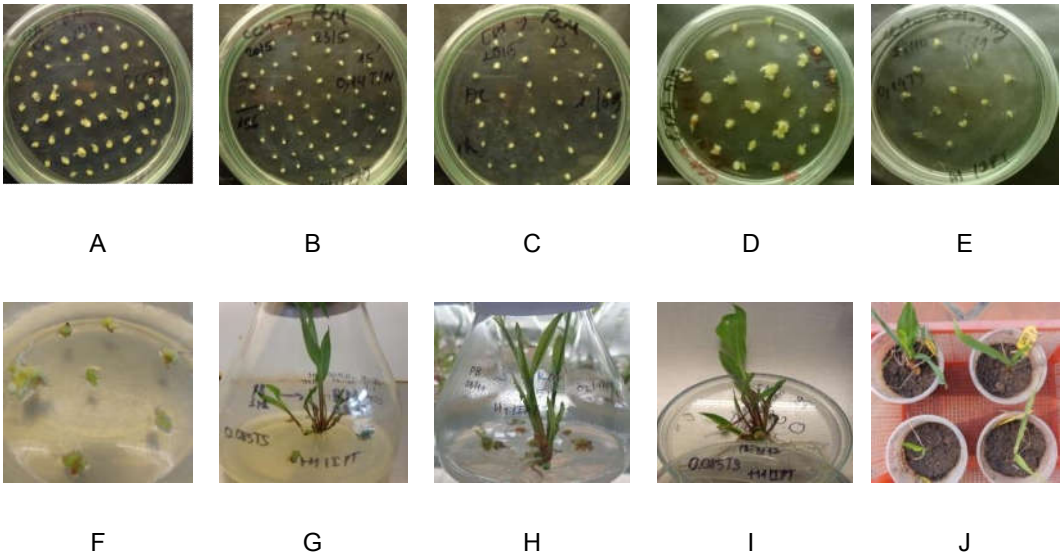
Khả năng tiếp nhận gen ngoại lai của dòng ngô thí nghiệm được biểu hiện thông qua tỉ lệ tạo mô sẹo phôi hóa trên môi trường chọn lọc của phôi non sau chuyển gen. Trong 5 công thức thí nghiệm cho thấy tại cường độ từ trường 0,085T/S dòng ngô VH1 có tỉ lệ tạo mô sẹo đạt 57,42%, cao nhất so với các công thức còn lại. Ở cường độ 0,14T/N cho tỉ lệ tạo mô sẹo thấp nhất. Đối với công thức đối chứng, tỉ lệ tạo mô sẹo đạt 54,19%. So sánh tỉ lệ tạo mô sẹo ở cùng công thức từ trường nhưng khác biệt về cực

từ tại hai công thức 0,085T và 0,14T cho thấy không có sự khác biệt lớn về chỉ tiêu này.

Giai đoạn tái sinh chồi mẫu được đặt trong hệ thống từ trường. Kết quả trên bảng 3 cho thấy có sự khác biệt khá lớn giữa các công thức từ trường về tỷ lệ tái sinh chồi của dòng ngô VH1 chuyển gen. Dòng ngô VH1 cho tỷ lệ tạo mô sẹo thấp nhất ở công thức 0,14 T/N nhưng cho tỷ lệ tái sinh chồi cao nhất (68,39-87,77%) so với công thức còn lại. Tại công thức 0,85T, tỉ lệ tái sinh chồi đạt thấp hơn (43,77% - 48,44%). Như vậy, có thể kết luận từ trường có ảnh hưởng lên sự tái sinh chồi chuyển gen.

Đánh giá khả năng sống sót của cây chuyển gen tái sinh khi đưa ra bầu đất, chúng tôi đã nhận được số cây chuyển gen tái sinh nhiều nhất (153 cây) ở cường độ từ trường 0,14T/N và ít nhất (34 cây) ở công thức đối chứng. Ở công thức 0,85T/S thu được 123 cây.

Như vậy, cường độ từ trường 0,14T có ảnh hưởng lên quá trình đồng nuôi cấy và giai đoạn tái sinh chồi chuyển gen. Các cực khác nhau của từ trường không ảnh hưởng đến hiệu quả chuyển gen vào phôi non ngô.



Hình 3. Ảnh hưởng của từ trường không đều tới hiệu quả chuyển gen vào phôi non dòng ngô VH1

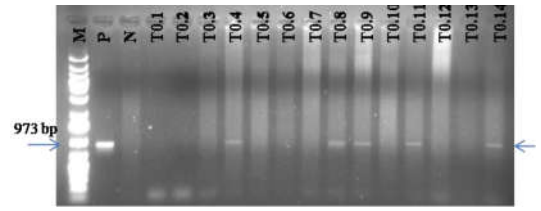
A,B,C: Nuôi cấy phục hồi ở CT từ trường 0,085T, 0,14T và 0T (ĐC), D, E: Tạo mô sẹo trên môi trường chọn lọc, F: Tái sinh chồi trên môi trường chọn lọc, G, H: Cây tái sinh hoàn chỉnh trên môi trường tạo rễ ở hai công thức 0,14T và 0,085T, I: Cây chuyển gen ra đất, J: Chuyển cây ra bầu đất

3. Phân tích cây chuyển gen

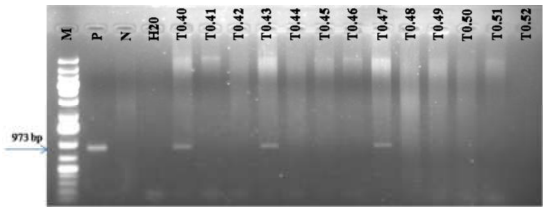
DNA tổng số từ mẫu lá của 55 cây chuyển gen sống sót được tách chiết và sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR với cặp mồi IPT-F; IPT-R. Kết quả thu được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Kết quả phân tích PCR các dòng ngô chuyển gen

STT	Cường độ từ trường	Tổng số phôi biến nạp	Số cây phân tích	Số cây dương tính với PCR	Hiệu suất biến nạp (%)
1	0,085T/N	1819	6	1	0,05
2	0,085T/S	1699	11	1	0,06
3	0,14T/N	1685	30	2	0,11
4	0,14T/S	1451	6	3	0,21
5	ĐC	1527	2	1	0,07
	Tổng số		55	8	



M. Marker 1kb (Fermentas), P. Plasmid pSIchyg-2,N: VH1, T0.15-T0.68: Các mẫu chuyển gen thuộc công thức 0.14T/N; T0.66-T0.72: Các mẫu chuyển gen thuộc công thức 0.14T/S



M. Marker 1kb (Fermentas), P. Plasmid pSIchyg-2, N: VH1, T0.40-T0.41: CT ĐC; T0.42-T0.46: Các mẫu chuyển gen thuộc công thức 0.085T/N; T0.47-T0.52: Các mẫu chuyển gen thuộc công thức 0.085T/S

Hình 4. Kết quả phân tích PCR các cây ngô chuyển gen *IPT*

Kết quả phân tích PCR cho thấy, trong tổng số 55 mẫu DNA của các cây chuyển gen tái sinh, có 8 cây cho kết quả dương tính với kích thước băng DNA thu được 973 bp, phù hợp với kích thước lý thuyết của một đoạn DNA nằm trên gen *IPT*. Trong 4 công thức từ trường, công thức 0,14 T/S có tần số chuyển gen cao nhất 0,21%, trong khi đó ở công thức 0,085T/N có tần số chuyển gen thấp nhất (0,05%). Nghiên cứu tương tự của Bialis và cộng sự (2012) cho thấy tại cường độ 125mT và 250 mT đã làm tăng sự nảy mầm của hạt, tăng trọng lượng tươi (Flozez *et al*., 2007). Ở cường độ 100 mT và 200 mT làm tăng hàm lượng tinh bột tạo thành (Hasenstein *et al*., 2013). Cũng với cường độ như trên, từ trường đã làm tăng hoạt động của enzyme bảo vệ chống lại sự oxi hóa, giảm các enzyme oxi hóa (Anand *et al*, 2012; Shine and Guruprasad, 2012; Turker *et al*, 2007; Javed *et al*, 2011). Như vậy, các nghiên cứu về ảnh hưởng của từ trường trên cây ngô cho thấy tác động tích cực của từ trường lên các quá trình sinh học ở cây ngô với biên độ dao động từ 100 mT-250 mT. Nghiên cứu của chúng tôi cũng thu được kết quả tương tự, từ trường có cường độ 0,14T có ảnh hưởng tích cực đến hiệu suất biến nạp gen vào phôi non dòng ngô VH1 thông qua vi khuẩn *Agrobacterium.*

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

1. Kết luận

Nghiên cứu bước đầu đã xác định được từ trường không đều ở cường độ 0,14T có ảnh hưởng tích cực tới khả năng sinh trưởng của vi khuẩn *Agrobacterium* tại pha log và hiệu suất biến nạp gen *IPT* vào phôi non dòng ngô VH1 đạt 0,21%, tăng so với đối chứng (0,07%).

2. Đề nghị

Cần tiếp tục kiểm tra về sinh học phân tử các cây dương tính với phân tích PCR để khẳng định: Từ trường không đều ở cường độ 0,14T có ảnh hưởng tích tới hiệu suất biến nạp gen *IPT* vào phôi non dòng ngô VH1.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Anand, A., Nagarajan, S., Verma, A., Joshi, D., Pathak, P., and Bhardwaj, J. (2012), "Pre-treatment of seeds with static magnetic field ameliorates soil water stress in seedlings of maize (*Zea mays* L.) " *Indian J. Biochem. Biophys*, 49: 63-70.
2. Bilalis, D. J., Katsenios, N., Efthimiadou, A., and Karkanis, A. (2012), "Pulsed elec-tromagnetic field an organic compatible method to promote plant growth and yield in two corn types", *Electromagn. Biol. Med,* 31: 333-343.
3. Dhawi. F, Al-Khayri. JM (2009), "The effect of magnetic resonance imaging on date palm (*Phoenix dactylifera* L.) elemental composition", *Communications in Biometry and Crop Science,* 4 (1): 14-20.
4. FAO (2014), "The state of Food Insecurity in the world". http://www.fao.org/publications/sofi/2014/en/
5. Florez, M., Carbonell, M.V., and Martinez, E. (2007), "Exposure of maize seeds to stationary magnetic fields: effects on germination and early growth", *Environ.Exp. Bot.* 59: 68-75.
6. Hasenstein, K.H., John, S., Scherp, P., Povinelli, D., andMopper, S. (2013), "Analysis of magnetic gradients to study gravitropism", *Am. J. Bot. 100*, pp. 249-255
7. Phạm Thị Lý Thu (2007), "Nghiên cứu xây dựng hệ thống tái sinh từ phôi non và xác định phương pháp chuyển gen thích hợp ở ngô", Luận án tiến sỹ Sinh học, Viện Công nghệ Sinh học, Viện khoa học và Công nghệ Việt Nam.
8. Van PT, Teixeira da Silva JA, Ham LH, Tanaka M (2012), "Effects of permanent magnetic fields on growth of *Cymbidium* and *Spathiphyllum*", *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 48: 225-232.

Ngày nhận bài: 11/9/2015
Người phản biện: PGS. TS Phạm Xuân Hội
Ngày phản biện: 12/10/2015
Ngày duyệt đăng: 16/10/2015

NGHIÊN CỨU CHUYỂN GEN KHÁNG THUỐC TRỪ CỎ VÀO GIỐNG ĐẬU TƯƠNG DT2008 VÀ ĐT26 THÔNG QUA VI KHUẨN AGROBACTERIUM

Đặng Trọng Lương[1], Nguyễn Thúy Điệp[1], Phạm Văn Tuân[1],
Phí Công Nguyên[1], Nguyễn Thị Huyền Trang[1]

The study on effect of magnetic field to the Agrobacterium mediated transformation efficiency into maize immature embryos

Abstract

The magnetic field is a natural component of our environment, influencing all living organisms. In this study, the effects of magnetic field on bacterial growth and Agrobacterium tumefaciens mediated gene transfer in maize immature embryos was determined. The bacterial growth in log phase was strongest with intensity of magnetic field 0.14T at Southern as well as Northern pole. To estimate the effect of magnetic field, the explants in petri dishes were exposed to 0.085T and 0.14 T magnetic field for cocultivation and regeneration periods at Southern and Northern pole of magnetic field. The results showed that the intensity of magnetic field at 0.14T has positive effect on the cocultivation stage and the transgenic shoot regeneration stage when compared with control explants. The different poles of the magnetic field does not significantly affect to the gene transformation efficiency into maize immature embryo. The considerable increase of gene transformation efficiency in the formula 0.14T/S was 0.21% whereas this ratio was 0.07% in the control fomula.

Key words: Agrobacterium tumefaciens, maize, transformation, EPSPS, immature embryo.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nước ta là một nước nông nghiệp với đặc điểm nổi bật là mật độ dân số cao, bình quân đất nông nghiệp trên đầu người chỉ đạt khoảng 765m^2/người. Diện tích canh tác đang ngày càng thu nhỏ lại, nhường chỗ cho thành thị, đường giao thông, khu dịch vụ và phát triển công nghiệp. Ước tính hàng năm chúng ta mất 50000-70000 ha đất canh tác. Trong khi đó biến đổi khí hậu toàn cầu, kéo theo sự xâm mặn nghiêm trọng, mưa gió bất thường gây ra hạn hán, lũ lụt, dịch bệnh đang đe dọa an ninh lương thực của đất nước. Đặc biệt, trong điều kiện mất đất canh tác, với mức tăng dân số như hiện nay, ngành nông nghiệp phải cung cấp thêm cho đất nước ít nhất 1 triệu tấn lương thực hàng năm.

Đậu tương là loại cây trồng được quan tâm và chú trọng nhất hiện nay, theo thống kê đến tháng 03/2012 diện tích trồng đậu tương của nước ta ở thời điểm này là 181,5 nghìn ha, năng suất bình quân là 14,6 tạ/ha. Tuy vậy, hàng năm nước ta vẫn phải nhập khẩu một số lượng lớn đậu tương 2,3 triệu tấn, đứng thứ hai trên toàn Châu Á sau Indonesia. Bên cạnh đó, cây trồng biến đổi gen nói chung và đậu tương biến đổi gen nói riêng đã được chính phủ Việt Nam cho phép một trong ba cây trồng khảo nghiệm đánh giá trong điều kiện Việt Nam, từng bước đưa vào sản xuất trong những năm tới. Trước những yêu cầu cần phải có để tạo được giống cây trồng chuyển gen thì việc xây dựng quy trình và chuyển gen thích hợp và có hiệu quả là một trong những đòi hỏi cần thiết. Do đó, trong bài báo này, chúng tôi đã thực hiện "**Nghiên cứu chuyển gen kháng thuốc trừ cỏ vào giống đậu tương DT2008 và ĐT26 thông qua vi khuẩn *Agrobacterium*".**

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu được sử dụng trong thí nghiệm bao gồm các giống đậu tương DT2008 và ĐT26 có nguồn gốc của Viện Di tuyền Nông nghiệp và Trung tâm Nghiên cứu và phát triển Đậu đỗ, Viện Cây lương thực và Cây thực phẩm, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam.

Môi trường nuôi cấy sử dụng môi trường cơ bản MS (Murashi Skoog, 1962) và vitamin Gamborg B5 (Gamborg, 1976) có thay đổi và sử dụng các chất kích thích sinh trưởng khác nhau

Chủng *A. tumefaciens* C58C1, vector pCAMBIA2300 mang gen *CP4-EPSPS* kháng

1. Viện Di truyền Nông nghiệp