

NGHIÊN CỨU BIẾN NẠP GEN KHÁNG HẠN VÀO MỘT SỐ DÒNG NGŨ CHỌN LỌC THÔNG QUA VI KHUẨN *AGROBACTERIUM*

Nguyễn Văn Đồng, Phạm Thị Lý Thu,
Lê Thị Mai Hương, Phạm Thị Hương,
Lê Thị Thu Vê, Lê Thị Lan,
Nguyễn Chiến Hữu, Lê Huy Hàm

SUMMARY

Research of drought tolerance gen transfer into select maize lines through *agrobacterium*

Nowaday, researches of drought tolerance ability and breeding drought tolerance transgenic maize lines were conducted in laboratories and seed companies on the world, with different levels, from basic researches to transfer gen application research for developing new varieties. However, in Vietnam have never been organization or institute published to create successfully drought tolerance transgenic maize line. The transformation experiments were conducted through *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404, EHA105, EHA101 which contains vector *CaMV35S::ZmNF-YB*, *CaMV35S:: ZmNAC1*, *SARK::IPT* carry insect drought tolerance gen to transfer to 3 select maize lines VH1, CM8, C8H9. The results revealed that the transformation system using vector *CaMV35S::ZmNF-YB*, *CaMV35S:: ZmNAC1* carry drought tolerance and *bar* selectable marker genes (phosphinothricin resistant) is more effective than the system using vector *SARK::IPT* carry drought tolerance and *hpt* genes (hygromycin resistant) respectively. Two maize lines VH1 and C8H9 have transformation efficiency better than the line CM8.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*, maize (*Zea mays* L), transformation, ZmNF-YB, ZmNAC1, IPT, immature embryos.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngũ (*Zea mays* L.) là một trong ba cây lương thực quan trọng nhất trên thế giới. So với lúa mì và lúa gạo thì ngô đứng thứ ba về diện tích, thứ hai về năng suất nhưng thứ nhất về sản lượng. Tính đến năm 2009 diện tích trồng ngô thế giới vào khoảng 158 triệu ha, năng suất 4,96 tấn/ha, sản lượng đạt 785,1 triệu tấn. Theo dự đoán vào năm 2020, nhu cầu ngô sẽ tăng lên 50% với hơn 800 triệu tấn một năm hiện nay và có thể vượt qua cả gạo và lúa mì (Pingali và Padney, 2001).

Nông nghiệp hiện đang sử dụng 70% nguồn nước ở các nước đang phát triển và 86% nguồn nước ở các nước phát triển và nguồn nước ngọt đang ngày càng trở nên

khan hiếm do hiện tượng biến đổi khí hậu, vì vậy các giống ngô chịu hạn và có khả năng sử dụng nước hiệu quả đang được coi là hướng ưu tiên nghiên cứu nhằm phát triển giống ngô trong tương lai. Cả hai phương pháp chọn giống truyền thống và chọn giống bằng công nghệ sinh học đều đang được áp dụng để chọn tạo ra các giống cây trồng có khả năng chịu hạn. Trong đó nghiên cứu chọn tạo giống ngô biến đổi gen chịu hạn là một hướng nghiên cứu rất được chú trọng trên thế giới.

Năm 2007, Nelson và CS đã tạo được dòng ngô chuyển gen chịu hạn mang gen *AtNF-YB1*, nghiên cứu của Assem và CS tạo dòng ngô chuyển gen chịu hạn mang gen *NPK1*. Các tác giả này cũng đã chỉ ra rằng giống ngô biến đổi gen mang gen điều

khiến tính chịu hạn (*ZmNF-YB2*) của công ty Monsanto - Mỹ cho năng suất cao gấp hơn hai lần so với đối chứng khi thử nghiệm trên đồng ruộng châu Phi.

Trong các phương pháp chuyển gen vào thực vật hiện nay, phương pháp chuyển nạp gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* được đánh giá là đơn giản và dễ thực hiện hơn các phương pháp khác, phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm ở Việt Nam, mặt khác phương pháp này đã được Viện Di truyền Nông nghiệp áp dụng thành công trong nghiên cứu tạo cây ngô chuyển gen kháng sâu. Vì vậy công trình này đã được thực hiện nhằm chuyển nạp gen kháng hạn vào một số dòng ngô chọn lọc với mục tiêu chọn tạo được giống ngô chuyển gen chịu hạn trong điều kiện nước ta.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu

Các cây ngô mẹ cho vật liệu phôi non của ba dòng ngô VH1, CM8, C8H9 có khả năng tiếp nhận gen ngoại lai và tái sinh tốt được trồng tại trại thí nghiệm của Viện Di truyền Nông nghiệp.

Sử dụng chủng vi khuẩn *A. Tumefaciens* (LBA4404/ EHA105/ EHA101) mang vector *CaMV35S::ZmNF-YB* chứa gen kháng hạn *ZmNF-YB* và gen chỉ thị chọn lọc *bar* - kháng phosphinothricin, vector *CaMV35S:: ZmNAC1* chứa gen kháng hạn *ZmNAC1* và gen chỉ thị chọn lọc *bar* - kháng phosphinothricin và *SARK::IPT* chứa gen kháng hạn và gen chỉ thị chọn lọc *hpt* - kháng hygromycin.

Bảng 1. Vật liệu di truyền sử dụng trong nghiên cứu

Plasmid	pZY101::35S	pZY101::35S	pSIchYG-2
Cấu trúc gen chuyển	CaMV35S::ZmNF-YB	CaMV35S:: ZmNAC1	SARK::IPT
Chỉ thị chọn lọc thực vật	Phosphinothricin (3 mg/l)	Phosphinothricin (3 mg/l)	Hygromycin (5 g/l)

2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp thu mẫu và biến nạp gen

Biến nạp các vector mang gen chịu hạn vào các chủng *A. tumefaciens* thích hợp cho chuyển gen vào cây 1 lá mầm (LBA4404/ EHA105/ EHA101) bằng phương pháp xung điện theo quy trình của Weigel và Glazebrook (2002). Kiểm tra các chủng *A. tumefaciens* sau biến nạp bằng cách nuôi cấy trên môi trường LB có bổ sung kháng sinh thích hợp. Nuôi cấy lỏng, tách DNA plasmid theo quy trình của Sambrook và Russell (2001). Tiến hành phản ứng PCR khuẩn lạc và DNA plasmid với cặp môi của gen tương ứng.

Phôi non được tách từ các bắp ngô ở giai đoạn 15 - 18 ngày sau thụ phấn. Phôi non sau khi tách được lấy nhiễm và đồng

nuôi cấy với vi khuẩn *A. tumefaciens* theo quy trình của Phạm Thị Lý Thu (2007), Hensel và CS (2009) có cải tiến theo quy trình của Phòng thí nghiệm Hệ gen học đậu tương và Di truyền phân tử, Đại học Tổng hợp Missouri (Columbia, Mỹ). Các phôi non sau khi lấy nhiễm được cấy với mật độ 25 - 30 phôi/đĩa petri 10cm trên môi trường đồng nuôi cấy. Sau đó, phôi non lần lượt được chuyển qua các môi trường nuôi phục hồi và chọn lọc. Những mô sẹo tạo thành sống sót sau quá trình chọn lọc được đưa vào môi trường tái sinh. Cây chuyển gen tái sinh thu được trên môi trường chọn lọc được đưa ra trồng tại nhà lưới.

Phân tích 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 (Hoisington, 1992) có cải tiến cho phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm. Kiểm tra nồng độ và độ tinh sạch của DNA tổng số bằng máy quang phổ nanodrop, sau đó tiến hành điện di trên gel agarose 1%. Dựa vào kết quả điện di có thể thấy DNA được đảm bảo về độ tinh sạch và tính nguyên vẹn, có thể dùng làm khuôn cho phân tích PCR.

Phân tích PCR

Phân tích PCR tiến hành với cặp mồi HPT-F/HPT-R đặc hiệu cho gen *hpt* và cặp mồi BAR-F/BAR-R đặc hiệu cho gen *bar*; thành phần PCR được bổ sung betaine và DMSO để tăng độ nhạy; chương trình phản ứng với cặp mồi HPT-F/HPT-R là 94°C/5 phút, 94°C/30 giây, 53°C/30 giây, 72°C/60 giây, lặp lại trong 30 chu kỳ, 72°C/5 phút, kết thúc - 4°C; chương trình phản ứng với cặp mồi BAR-F/BAR-R là 95°C/5 phút, 95°C/30 giây, 57°C/30 giây, 72°C/60 giây, lặp lại trong 30 chu kỳ, 72°C/5 phút, kết thúc - 4°C; Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%.

Bảng 2. Trình tự các đoạn mồi sử dụng trong nghiên cứu

STT	Tên mồi	Trình tự mồi
1	HPT-F	5'-AGAAGAAGATGTTGGCGACCT-3'
2	HPT-R	5'-GTCCTGCGGGTAAATAGCTG-3'
3	BAR-F	5'-CTTCAGCAGGTGGGTGTAGAG-3'
4	BAR-R	5'-GACTCGACGACGCGTAAAAC-3'

Các chỉ tiêu theo dõi và đánh giá

Các thông số sau được quan tâm để đánh giá hiệu quả của quá trình nuôi cấy và biến nạp gen:

Tỷ lệ tạo mô sẹo chuyển gen (%) = Số mô sẹo chuyển gen tạo thành*100%/Tổng số phôi biến nạp

Tỷ lệ tái sinh cây chuyển gen (%) = Số cây chuyển gen tái sinh*100%/Tổng số mô sẹo chuyển gen phôi hóa.

Hiệu suất biến nạp (%) = Số cây hữu thụ mang gen chuyển *100%/Tổng số phôi biến nạp.

năng tiếp nhận gen lạ và tái sinh tốt (là sản phẩm của đề tài *Tạo dòng ngô biến đổi gen kháng sâu/ kháng thuốc diệt cỏ*) làm vật liệu để chuyển gen chịu hạn. Kết quả thí nghiệm được thể hiện trong bảng 3.

Khả năng tiếp nhận gen ngoại lai của các dòng ngô thí nghiệm biểu hiện thông qua mức độ tạo mô sẹo phôi hóa trong môi trường chọn lọc của phôi non sau chuyển gen. Kết quả cho thấy tỷ lệ tạo mô sẹo từ phôi non sau khi biến nạp với 3 vector của dòng ngô VH1 và C8H9 khả quan hơn dòng CM8 (VH1 đạt trung bình 61,8%; C8H9 đạt 57,8%, CM8 đạt 53,9%).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Đánh giá các thí nghiệm chuyển gen kháng hạn vào các dòng ngô chọn lọc

Trong thí nghiệm biến nạp, nhằm rút ngắn thời gian chọn tạo các dòng ngô mang gen chịu hạn vì vậy sử dụng phôi non của các dòng ngô VH1, CM8, C8H9 có khả

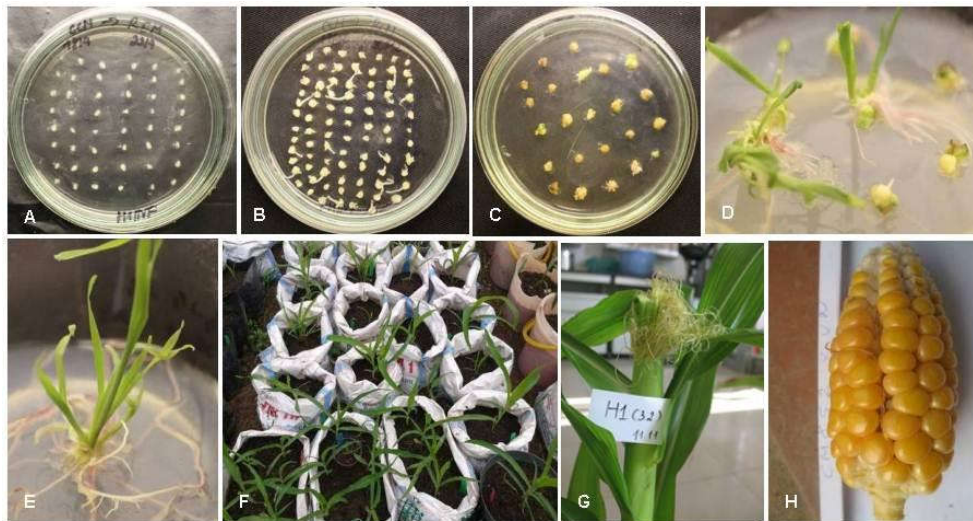
Trong các vector chuyển gen kháng hạn có mặt gen chọn lọc kháng một loại kháng sinh (hygromycin, phosphinothricin) cùng với gen quan tâm. Do đó chỉ các tế bào thực vật mang gen chuyển nạp mới phát triển được trên môi trường nuôi cấy có chất kháng sinh tương ứng. So sánh số liệu của ba hệ thống biến nạp trên bảng 3 cho thấy hệ thống biến nạp sử dụng vector CaMV35S::ZmNAC1,

CaMV35S::ZmNFYB2 với chỉ thị chọn lọc ở thực vật phosphinothricin mang lại kết quả khả quan hơn hẳn so với hệ thống biến nạp với vector SARK::IPT có chỉ thị chọn lọc ở thực vật hygromycin. Tỷ lệ tạo mô sẹo chuyển gen khi sử dụng hai vector này rất cao, đạt từ 53,3 - 70,5% so với tỷ lệ 30,8 - 52,5% của vector SARK::IPT.

Từ kết quả biến nạp với hơn 79.000 phôi của 3 dòng ngô, đã đưa ra bầu đất 200 cây, khi đưa ra môi trường tự nhiên có 146 cây sống sót khỏe mạnh, trong đó có 29 cây kết hạt (Hình 1). Những cây đưa ra bầu đất sống sót trong môi trường tự nhiên sẽ được thu mẫu lá để tách chiết DNA và phân tích PCR.

Bảng 3. Kết quả nghiên cứu biến nạp gen kháng hạn vào một số dòng ngô chọn lọc

TT	Vector biến nạp	Dòng	Số lượng mẫu				TL tạo mô sẹo (%)	TL tái sinh chồi (%)	Số cây đưa ra đất	Số cây sống sót khi đưa ra đất	Số cây hữu thụ
			CCM	REM	ECM	SeM					
1	SARK::IPT	VH1	17000	5147	2565	893	49,8	34,8	20	5	2
		CM8	10400	5009	1541	411	30,8	26,7	20	9	2
		C8H9	9000	4240	2228	709	52,5	31,8	23	18	2
2	CaMV35S::ZmNAC1	VH1	10225	5251	3578	1313	68,1	36,7	24	18	6
		CM8	6577	3391	2391	702	70,5	29,4	13	12	1
		C8H9	6540	3267	1740	601	53,3	34,5	24	20	4
3	CaMV35S::ZmNFYB2	VH1	8197	5945	4016	1708	67,6	42,5	30	27	1
		CM8	4621	2808	1694	232	60,3	13,7	11	6	0
		C8H9	6640	4538	3067	894	67,6	29,1	35	31	11
Tổng số			79200	39596	22820	7463			200	146	29



Hình 1: Thu nhận các dòng ngô chọn lọc chuyển gen kháng hạn. Phôi non sau khi lây nhiễm trên môi trường đồng nuôi cấy (A); phôi non trên môi trường nuôi phục hồi (B); chọn lọc và tạo mô sẹo phôi hóa (C); Tái sinh chồi từ mô sẹo (D); cây tái sinh (E) từ phôi non sau biến nạp với gen kháng hạn; cây chuyển gen tái sinh đưa ra đất (F); cây chuyển

gen sống sót trong môi trường tự nhiên hữu thụ tạo bắp (G) và bắp của dòng ngô chuyển gen T0 (H).

2. Phân tích PCR các dòng ngô chuyển gen

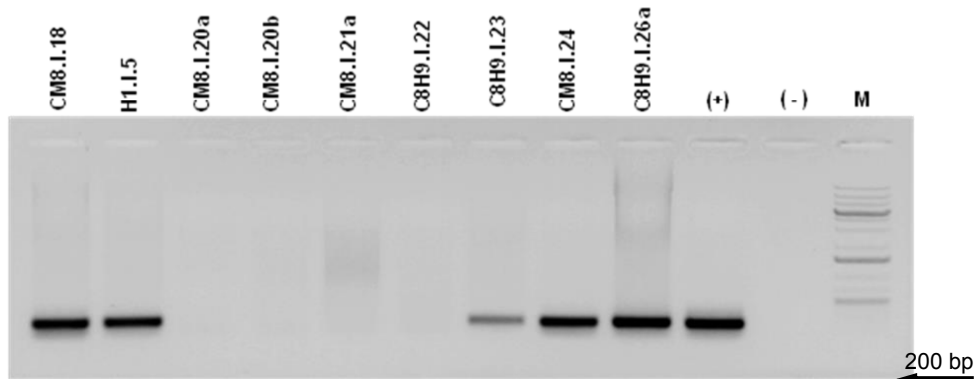
Phân tích PCR các cây chuyển gen cho thấy, trong 146 mẫu DNA của 3 dòng ngô thí nghiệm có 16 mẫu thuộc 3 dòng VH1, CM8 và C8H9 từ hệ thống biến nạp với vector SARK::IPT cho kết quả dương tính với kích thước băng DNA thu được 200 bp phù hợp với gen *hpt*, 9 mẫu thuộc 2 dòng VH1, C8H9 từ hệ thống biến nạp với vector CaMV35S::ZmNAC1 cho kết quả dương tính với kích thước băng DNA thu được 500 bp phù hợp với gen *bar* và 14 mẫu thuộc 2 dòng VH1, C8H9 từ hệ thống biến

nạp với vector CaMV35S::ZmNFYB2 cho kết quả dương tính với gen *bar*. Kết quả được thể hiện trong bảng 4, hình 2, 3 và hình 4.

Hiệu suất biến nạp gen chỉ thị chọn lọc của dòng VH1 và C8H9 tỏ ra ưu thế hơn hẳn so với dòng CM8 (VH1 đạt trung bình 0,05%; C8H9 đạt trung bình 0,09%; CM8 đạt trung bình 0,01%). Trong 3 hệ thống biến nạp, 2 hệ thống biến nạp sử dụng 2 vector CaMV35S::ZmNAC1 và CaMV35S::ZmNFYB2 cho thấy hiệu suất biến nạp khá ổn định và đồng đều trên cả 3 dòng ngô chọn lọc.

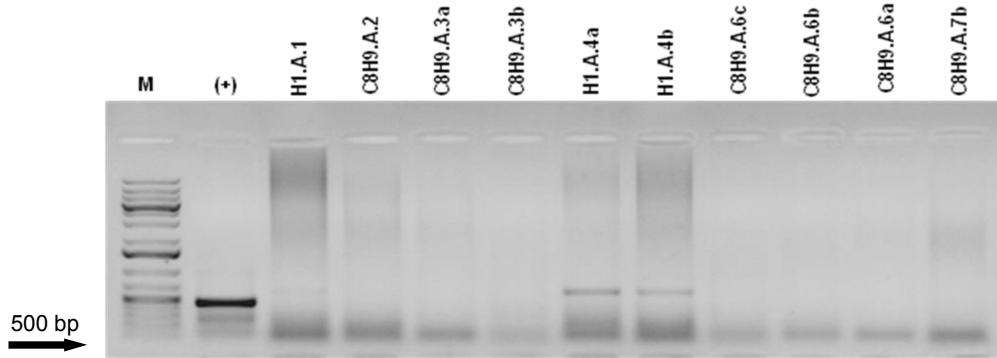
Bảng 4. Kết quả phân tích PCR các dòng ngô chuyển gen thế hệ T0

STT	Vector biến nạp	Dòng	Cây đưa ra đất	Kết quả phân tích PCR		Hiệu suất biến nạp gen (%)	
				gen <i>bar</i>	gen <i>hpt</i>	gen <i>bar</i>	gen <i>hpt</i>
1	SARK::IPT	VH1	20		1		0,006
		CM8	20		4		0,04
		C8H9	23		11		0,12
2	CaMV35S::ZmNAC1	VH1	24	6		0,06	
		CM8	13	0		0	
		C8H9	24	3		0,05	
3	CaMV35S::ZmNFYB2	VH1	30	7		0,09	
		CM8	11	0		0	
		C8H9	35	6		0,09	
Tổng số			200				

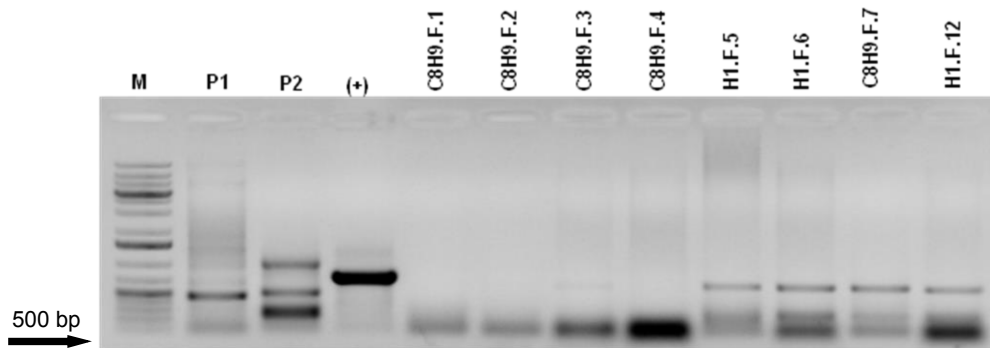


Hình 2: Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose sử dụng cặp mồi HPT-F/HPT-R. M. Marker 1 kb (Fermentas); (-). Mẫu H₂O; (+). Đối chứng dương tính (DNA plasmid mang gen *hpt*); Từ giếng C8H9.I.26a - CM8.I.18. 9 mẫu DNA tổng số tách từ lá của các cây

chuyển gen thế hệ T0; Các dòng C8H9.I.26a, CM8.I.24, C8H9.I.23, H1.I.5, và CM8.I.18 có mang gen hpt; dòng C8H9.I.22, CM8.I.21a, CM8.I.20b, CM8.I.20a không mang gen hpt.



Hình 3: Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose sử dụng cặp mồi BAR-F/BAR-R. M. Marker 1 kb (Fermentas); (+). Đối chứng dương tính (DNA plasmid mang gen bar); Từ giếng H1.A.1 - C8H9.A.7b. 10 mẫu DNA tổng số tách từ lá của các cây chuyển gen thế hệ T0; Các dòng H1.A.4a và H1.A.4b có mang gen bar; dòng H1.A.1, C8H9.A.2, C8H9.A.3a, C8H9.A.3b, C8H9.A.6c, C8H9.A.6b, C8H9.A.6a, C8H9.A.7b không mang gen bar.



Hình 4: Kết quả điện di sản phẩm PCR trên gel agarose sử dụng cặp mồi BAR-F/BAR-R. M. Marker 1 kb (Fermentas); P1. Plasmid pZY; P2. Plasmid pZY 35S; (+). Đối chứng dương tính (DNA plasmid NFYB2 mang gen bar); Từ giếng C8H9.F.1-H1.F.12. 8 mẫu DNA tổng số tách từ lá của các cây chuyển gen thế hệ T0; Các dòng H1.F.5, H1.F.6, C8H9.F.7, H1.F.12 có mang gen bar; dòng C8H9.F.1, C8H9.F.2, C8H9.F.3, C8H9.F.4 không mang gen bar.

IV. KẾT LUẬN

Nghiên cứu biến nạp gen kháng hạn *ZmNAC1*, *ZmNFYB2* và *IPT* vào 3 dòng ngô chọn lọc VH1, CM8, và C8H9 bước đầu đã thu được một số kết quả sau:

Sử dụng hệ thống biến nạp với vector CaMV35S::*ZmNAC1*, CaMV35S::*ZmNFYB2*

chứa gen kháng hạn và gen chỉ thị chọn lọc *bar* (kháng phosphinothricin) mang lại kết quả chuyển nạp ổn định và đồng đều trên 2 dòng ngô chọn lọc VH1 và C8H9. Kết quả bước đầu này tạo cơ sở quan trọng cho những nghiên cứu chuyển gen và phân tích cây chuyển gen tiếp theo nhằm tạo ra dòng ngô biến đổi gen chịu hạn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (2009) Báo cáo hàng năm. <http://www.agroviet.gov.vn>.
2. Nguyễn Văn Đồng và CS(2009) *Kết quả bước đầu nghiên cứu chuyển gen kháng sâu cryIA(c) vào phôi non các dòng ngô mô hình*. Tạp chí Công nghệ Sinh học 8(1): 1-8.
3. 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 sĩ Sinh học, Viện Công nghệ Sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.
4. Assem S., Hussein E., Hussein H., Basry M. (2009) *Genetic Transformation of the Nicotiana Protein Kinase (NPK1) Gene Confers Osmotic Tolerance in Egyptian Maize*. Australian Journal of Basic and Applied Sciences,3(2): 828-835.
5. Hensel G., Kastner C., Oleszczuk S., Riechen J., Kumlehn J. (2009) *Agrobacterium-Mediated Gene Transfer to Cereal Crop Plants: Current Protocols for Barley, Wheat, Triticale, and Maize*. International Journal of Plant Genomics 2009.

Ngày nhận bài: 10/4/2013
Người phản biện: GS. TSKH. Trần Duy Quý,
ngày 4/5/2013
Ngày duyệt đăng: 3/6/2013

**NGHIÊN CỨU NHÂN GIỐNG NẤM VÂN CHI (*TRAMETES VESICOLOR*)
DẠNG DỊCH THỂ**

Nguyễn Thị Bích Thùy, Cồ Thị Thùy Vân,
Đinh Xuân Linh, Trịnh Tam Kiệt,
Nguyễn Trung Thành

SUMMARY

**Study on the technological condition for submerged fermenter culture
of *Trametes versicolor* strain**

The Turkey tail *Trametes versicolor* has been considered the major medicinal mushroom worldwide, mainly due to its traditional usage, polysaccharopeptides have been purified from this species, showing experimental immunomodulatory and anti-cancer effects.

The growth of *Trametes versicolor* strain under liquid fermentation conditions was examined. The experiment results indicated that the turkey tail mushroom mycelium grew best on (2 gam Pepton + 2 gam yeast extract + 0,2 gam MgSO₄.7H₂O + 1gam KH₂PO₄ + 15gam glucose + 1,5 mg vitamin B1 + 1000ml distilled water) medium. On this medium, turkey tail mycelium was growing fast, mycelial dry weight is 35,2 g/ 1000ml, the highest number of mycelial pellet. Turkey tails mushroom mycelium grew best on in temperatures as 26 - 30 ° C. Different oxygen supply modes can significantly affect to the morphology and mycelia biomass, the optimal concentration of oxygen is 0,6 liters/ 1 liters liquid / minute. The suitable time to obtained the mycelium grew well at 72 - 84 hour.

Keywords: Submerged fermenter culture, Turkey tail.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nấm Vân chi có tên khoa học *Trametes versicolor* (Linnaeus.Fries) Pilat; thuộc họ

Polyporaceae, bộ Aphyllophorales, lớp Hymenomycetes, ngành Basidiomycota. Trong Y học cổ truyền Trung Quốc, nấm Vân chi được sử dụng để làm giảm trầm