

Yan J., Chuai G., Zhou C., Zhu C., Yang J., Zhang C., Gu F., Xu H., Wei J. & Liu Q., 2018. Benchmarking CRISPR on-target sgRNA design. *Briefings in Bioinformatics*, 19 (4): 721-724. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx001>.

Yang J., C.-T.E., Yeh R.K., Ramamurthy X., Qi R.L., Fernando J.C.M., Dekkers D.J. Garrick D., Nettleton P.S., Schnable, 2018. Empirical comparisons of different statistical models to identify and validate kernel row number-associated

variants from structured multi-parent mapping populations of maize. *G3 Genes Genomes Genetics*, 8 (11): 3567-3575. <https://doi.org/10.1534/g3.118.200636>.

Yang J., Liu Z., Chen Q., Qu Y., Tang J., Lübberstedt T. & Li H., 2020. Mapping of QTL for grain yield components based on a DH population in maize. *Scientific Reports*, 10 (1): 7086. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63960-2>.

Design of the CRISPR/Cas9 construct for inducing mutations in the promoter of the *ZmCLE7* gene in Vietnamese maize varieties

Nguyen Hong Nhung, Nguyen Van Doai, Nguyen Xuan Cuong, Pham Thi Hang, Nguyen Thi Lieu, Doan Thi Bich Thao, Khuat Huu Trung, Nguyen Huu Kien, Do Tien Phat

Abstract

In Vietnam, maize is one of the most important cereal crops that plays an important role in the national economy and food security. Improving the maize yield, especially in local varieties has gained a lot of attention from scientists and breeders. Recently, the CRISPR/Cas system has been considered as an effective and potential strategy. In this study, the promoter region of the *ZmCLE7* gene in local maize varieties was cloned and sequenced in Vietnam. The *ZmCLE7* gene has been known to regulate the kernel number per ear through controlling the IM activity. Based on the obtained sequences, three on-targeted guide-RNAs (gRNA) were selected to induce mutations in the promoter of the *ZmCLE7* gene in some Vietnamese maize varieties. All three gRNA sequences were successfully ligated with the pBUE411 gene transfer vector to form the CRISPR/Cas9 system (pBUE-PrCLE7). The pBUE-PrCLE7 gene editing system will be used for further gene transformation to create targeted mutations on *ZmCLE7* promoters of different Vietnamese maize varieties.

Keywords: Maize, Vietnamese maize varieties, gene editing, CRISPR/Cas9 structure

Ngày nhận bài: 23/7/2024

Ngày phản biện: 20/8/2024

Người phản biện: TS. Nguyễn Thị Tường Vân

Ngày duyệt đăng: 09/12/2024

NGHIÊN CỨU CHUYỂN CẤU TRÚC CRISPR/CAS9 VÀO GIỐNG NGÔ K7 NHẪM CHỈNH SỬA VÙNG PROMOTER CỦA GEN *ZmCLE7*

Nguyễn Hữu Kiên^{1*}, Nguyễn Thị Hiệp¹, Nguyễn Thị Ngọc Minh¹, Nguyễn Thị Liễu¹, Khuất Hữu Trung¹, Đỗ Tiến Phát², Đoàn Thị Bích Thảo³, Nguyễn Lê Trang⁴

TÓM TẮT

Công nghệ chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 là một bước đột phá quan trọng trong sinh học và nông nghiệp, cho phép thay đổi gen tại bất kỳ vị trí nào trong genome, mở ra tiềm năng cải thiện các đặc tính sinh học của cây trồng. Tuy nhiên, hiệu quả ứng dụng công nghệ này trong cây trồng, đặc biệt là ngô, phụ thuộc vào nhiều yếu tố như chủng vi khuẩn, mật độ vi khuẩn và điều kiện nuôi cấy. Nghiên cứu này tập trung tối ưu hóa quy trình chuyển gen vào phôi non giống ngô K7 thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* mang cấu trúc PZY102:GUS làm nền tảng để chỉnh sửa vùng promoter của gen *ZmCLE7* bằng CRISPR/Cas9. Quy trình bao gồm: lây nhiễm phôi 11 ngày sau thụ phấn với dung dịch vi khuẩn (OD₆₀₀ = 0,5) trong 30 phút, nuôi trên môi trường CCM 3 ngày, sau đó chuyển qua môi trường tạo mô sẹo ECM1, bổ sung 2 mg/L 2,4-D và 3 mg/L chất chọn lọc glufosinate trong 14 ngày. Tiếp theo, phôi được nuôi trên môi trường ECM2 với 6 mg/L glufosinate trong 14 ngày, rồi chuyển qua SEM1, SEM2 và cuối cùng là môi trường RM để tạo cây hoàn chỉnh. Kết quả PCR từ 6 cây sống sót cho thấy 1 cây chứa gen *Cas9* và 2 cây chứa gen *Bar*, minh chứng khả năng chuyển cấu trúc CRISPR/Cas9 vào giống ngô K7. Nghiên cứu này đặt nền tảng quan trọng cho việc áp dụng công nghệ CRISPR/Cas9 nhằm nâng cao năng suất, chất lượng và khả năng chống chịu với điều kiện bất lợi ở cây ngô.

Từ khóa: Cây ngô, giống ngô K7, chỉnh sửa gen, cấu trúc CRISPR/Cas9

¹ Viện Di truyền Nông nghiệp, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

² Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

³ Viện nghiên cứu Ngô, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam; ⁴ Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam

* Tác giả liên hệ, email: kienbio280888@gmail.com

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngô (*Zea mays* L.) là một loại cây ngũ cốc quan trọng trên toàn cầu, chiếm vai trò quan trọng trong an ninh lương thực và phát triển kinh tế. Năm 2022, sản lượng ngô toàn cầu đạt hơn 1,2 tỷ tấn, trong đó Hoa Kỳ, Trung Quốc và Brazil là ba quốc gia sản xuất hàng đầu, chiếm khoảng 60% tổng sản lượng (FAO, 2023). Ngô không chỉ được sử dụng làm thức ăn chăn nuôi (chiếm hơn 60% tổng sản lượng toàn cầu) mà còn là nguyên liệu quan trọng trong ngành công nghiệp chế biến thực phẩm và nhiên liệu sinh học, đóng góp lớn vào giá trị kinh tế (Ngô Hữu Tình, 2009). Ở Việt Nam, ngô là một nguồn thức ăn chăn nuôi chủ lực, chiếm 90% sản lượng sử dụng nội địa. Tuy nhiên, do hạn chế về năng suất, Việt Nam phụ thuộc nhiều vào nhập khẩu ngô để đáp ứng nhu cầu. Năm 2022, Việt Nam nhập khẩu 11,4 triệu tấn ngô, trị giá 3,1 tỷ USD, tăng so với các năm trước (Tổng cục Hải quan, 2023). Trong bối cảnh dân số tăng nhanh và tác động ngày càng rõ rệt của biến đổi khí hậu, nhu cầu về các giống ngô có năng suất cao và khả năng chống chịu tốt càng trở nên cấp thiết.

Công nghệ chỉnh sửa gen, đặc biệt là hệ thống CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated protein 9), đã trở thành công cụ quan trọng trong nghiên cứu và phát triển giống cây trồng. So với các phương pháp chỉnh sửa gen trước đây như Zinc Finger Nucleases (ZFNs), Transcription Activator Like Effector Nuclease (TALEN), CRISPR/Cas9 có tính linh hoạt cao, dễ áp dụng, chi phí thấp và hiệu quả vượt trội (Ran *et al.*, 2014). Nhiều nghiên cứu trên thế giới đã sử dụng CRISPR/Cas9 để cải thiện các đặc tính nông học của ngô, từ khả năng chống chịu stress môi trường đến tăng năng suất và chất lượng hạt.

Gần đây, các nghiên cứu đã tập trung vào việc chỉnh sửa gen thuộc nhóm *CLE* (*CLAVATA3/Embryo Surrounding Region*) của ngô, vốn được biết đến với vai trò điều chỉnh sự phát triển của mô phân sinh. Trong đó, gen *ZmCLE7* nhận được nhiều sự chú ý vì khả năng tác động đến số lượng và kích thước hạt. Các nghiên cứu ở Trung Quốc và Hoa Kỳ đã sử dụng CRISPR/Cas9 để chỉnh sửa vùng promoter của *ZmCLE7*, tạo ra các biến thể giảm biểu hiện, dẫn đến tăng năng suất hạt từ 15 - 30% mà không ảnh hưởng tiêu cực đến các đặc điểm nông học khác (Liu *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2023).

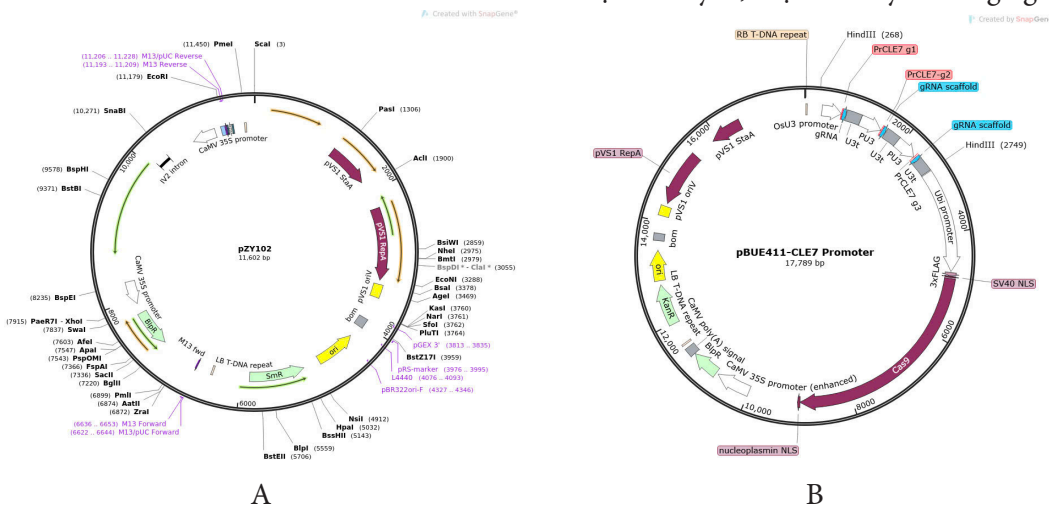
Việc ứng dụng công nghệ này vào các giống ngô bản địa của Việt Nam như giống K7 không chỉ góp phần nâng cao năng suất mà còn giúp giảm phụ thuộc vào nhập khẩu, thúc đẩy sản xuất nông nghiệp bền vững. Do đó, nghiên cứu này nhằm sử dụng CRISPR/Cas9 để chỉnh sửa vùng promoter của gen *ZmCLE7* thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*, tạo nền tảng cho việc phát triển giống ngô cải tiến ở Việt Nam, đáp ứng nhu cầu cấp bách về an ninh lương thực và thức ăn chăn nuôi.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu thực vật: Giống ngô K7 được sử dụng làm vật liệu cho chuyển gen có nguồn gốc từ Viện Nghiên cứu Ngô được lưu giữ tại Bộ môn Kỹ thuật Di truyền, Viện Di truyền Nông nghiệp.

Vật liệu vi khuẩn: Chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* EHA105 mang vector PZY102 biểu hiện gen *GUS* và *Bar* được cung cấp bởi Viện Công nghệ sinh học và chủng EHA105 mang vector CRISPR/Cas9 chứa các sgRNA cho chỉnh sửa vùng promoter của gen *ZmCLE7* và gen *Bar*, hiện đang lưu giữ tại Bộ môn Kỹ thuật Di truyền, Viện Di truyền Nông nghiệp.



Hình 1. Cấu trúc các vector sử dụng trong nghiên cứu

Ghi chú: (A) Cấu trúc vector PZY102, (B) cấu trúc pCAS9/sgRNA-CLE7pro cho chỉnh sửa vùng promoter của gen *ZmCLE7*.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đánh giá ảnh hưởng của tuổi phôi ngô lây nhiễm với *A. tumefaciens* đến hiệu quả chuyển gen vào phôi ngô

Bắp ngô của giống ngô K7 sau khi thụ phấn 7, 9, 11 và 13 ngày được thu và sử dụng cho thí nghiệm. Cụ thể, bắp ngô sau khi thu tiến hành loại bỏ lớp vỏ bên ngoài và khử trùng bắp bằng dung dịch nước javen (NaClO) 3% có bổ sung một vài giọt Tween-20 trong 20 phút, sau đó rửa lại bằng nước cất khử trùng 5 lần. Tiếp theo, phôi được tách từ các bắp ngô bằng vật dụng chuyên dùng trong điều kiện vô trùng và ngâm phôi trong môi trường IM (MS cơ bản (Murashige & Skoog) bổ sung 68,5 g/L sucrose, 36 g/L glucose, 200 mM acetosyringone (AS), pH: 5,2) đến khi lây nhiễm với khuẩn.

Chủng khuẩn *A. tumefaciens* EHA105 mang vector PZY102 có chứa gen *GUS* được nuôi cấy trên môi trường YEP đặc có chứa kháng sinh 25 mg/L Rifampicin, 50 mg/L Spectinomycin và 50 mg/L Streptomycin ở 28°C trong 2 - 3 ngày. Trước khi biến nạp, khuẩn lạc được lấy từ đĩa YEP hòa tan trong môi trường IM-AS lỏng tới mật độ OD = 0,5, nuôi lắc 100 vòng/phút, ở 28°C 3 - 4 giờ để tạo dịch huyền phù vi khuẩn lây nhiễm với phôi ngô. Bổ sung dịch khuẩn *A. tumefaciens* vào eppendorf 2 mL chứa 30 phôi non, lắc 30 phút. Tiếp theo phôi ngô được thấm khô và nuôi cấy lên môi trường đồng nuôi cấy CCM đặc (MS cơ bản bổ sung 30 g/L sucrose, 0,4 g/L L-cysteine, 7 g/L Gellan-gum, 8,5 mg/mL Silver nitrate (AgNO₃), 200 mM AS, pH: 5,8) 3 ngày trong tối ở nhiệt độ 20°C. Sau đó, phôi ngô sống sót được sử dụng cho phân tích hoạt tính *GUS* và thống kê số phôi ngô có biểu hiện gen *GUS*.

Hoạt tính β -glucuronidase (*GUS*) được phân tích theo phương pháp của Kim và cộng sự (2006). Các phôi ngô được ngâm trong dung dịch X-Gluc và lắc nhẹ ở nhiệt độ 37°C trong 2 - 4 giờ. Sau khi nhuộm, phôi được rửa sạch bằng cồn 70% 3 lần, 5 phút/lần. Mô sẹo biểu hiện hoạt tính *GUS* có màu xanh da trời. Các thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên hoàn toàn, lặp lại 3 lần; tối thiểu 30 phôi/công thức/lần lặp lại.

2.2.2. Đánh giá ảnh hưởng của mật độ *A. tumefaciens* đến hiệu quả chuyển gen vào phôi ngô

Bắp ngô sau khi thụ phấn 11 ngày được thu hoạch, bóc vỏ, khử trùng, tách phôi và bảo quản trong môi trường IM-AS lỏng. Dung dịch vi khuẩn *A. tumefaciens* được chuẩn bị trong môi trường IM-AS lỏng với các công thức có giá trị OD_{600nm} lần lượt là 0; 0,25; 0,5; 0,75 và 1.

Phôi ngô được lây nhiễm với vi khuẩn trong thời gian 30 phút sau đó đồng nuôi cấy trên môi trường CCM trong 3 ngày. Sau 3 ngày, phôi ngô sống sót được sử dụng cho phân tích hoạt tính *GUS* (mục 2.2.1) và số mô sẹo có thể biểu hiện gen *GUS* được thống kê. Các thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên hoàn toàn, lặp lại 3 lần; tối thiểu 30 mô sẹo/công thức/lần lặp lại.

2.2.3. Đánh giá ảnh hưởng của thời gian lây nhiễm đến hiệu quả chuyển gen vào phôi ngô

Bắp ngô sau khi thụ phấn 11 ngày được thu hoạch, bóc vỏ, khử trùng, tách phôi và bảo quản trong môi trường IM-AS lỏng. Dung dịch vi khuẩn *A. tumefaciens* được chuẩn bị trong IM-AS lỏng với giá trị OD_{600nm} đạt 0,5. Phôi ngô được lây nhiễm với *A. tumefaciens* ở các công thức thời gian lần lượt là 15 phút, 30 phút, 45 phút, 60 phút. Tiếp theo đồng nuôi cấy ở CCM đặc trong 3 ngày. Sau 3 ngày, phôi ngô sống sót được sử dụng cho phân tích hoạt tính *GUS* (mục 2.2.1) và số mô sẹo có thể biểu hiện gen *GUS* được thống kê cho phân tích. Các thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên hoàn toàn, lặp lại 3 lần; tối thiểu 30 mô sẹo/công thức/lần lặp lại.

2.2.4. Đánh giá ảnh hưởng của thời gian đồng nuôi cấy đến hiệu quả chuyển gen vào phôi ngô

Bắp ngô sau khi thụ phấn 11 ngày được thu hoạch, bóc vỏ, khử trùng, tách phôi và bảo quản trong môi trường IM-AS lỏng. Dung dịch vi khuẩn *A. tumefaciens* được chuẩn bị trong IM-AS lỏng với giá trị OD_{600nm} đạt 0,5. Phôi ngô được lây nhiễm với dịch khuẩn trong thời gian 30 phút sau đó đồng nuôi cấy trên CCM đặc với các công thức thời gian lần lượt là 1 ngày, 2 ngày, 3 ngày, 4 ngày và 5 ngày. Sau khoảng thời gian ở các công thức, phôi ngô sống sót được sử dụng cho phân tích hoạt tính *GUS* (mục 2.2.1) và ghi lại số mô sẹo có thể biểu hiện gen *GUS*. Các thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên hoàn toàn, lặp lại 3 lần; tối thiểu 30 mô sẹo/công thức/lần lặp lại.

Từ mục 2.2.1 đến 2.2.4, tính hiệu quả tiếp nhận gen *GUS* (%) = (Tổng số phôi biểu hiện gen *GUS*/Tổng số mẫu cấy trên môi trường đồng nuôi cấy) × 100%.

2.2.5. Hoàn thiện quy trình chuyển nạp cấu trúc CRISPR/Cas9 cho chỉnh sửa vùng promoter của gen *ZmCLE7* vào giống ngô K7

Bắp ngô sau khi thụ phấn 11 ngày được thu hoạch, bóc vỏ, khử trùng, tách phôi và bảo quản trong môi trường IM-AS lỏng (mục 2.2.1). Khuẩn lạc *A. tumefaciens* EHA105 mang cấu trúc CRISPR/Cas9

cho chỉnh sửa vùng promoter của gen *ZmCLE7* được nuôi cấy trên môi trường YEP đặc có chứa 25 mg/L Rifampicin và 50 mg/L Kanamycin. Chủng khuẩn EHA105 mang cấu trúc PZY102 có chứa gen *GUS* được sử dụng đồng thời trong thí nghiệm. Dung dịch vi khuẩn *A. tumefaciens* được chuẩn bị trong IM-AS lỏng như (mục 2.2.1) với giá trị OD_{600nm} đạt 0,5. Phôi ngô được lây nhiễm trong 30 phút và đồng nuôi cấy trên CCM đặc (mục 2.2.1). Sau 3 ngày đồng nuôi cấy, phôi được cấy chuyển sang môi trường nuôi phục hồi ReM có nồng độ 2,4-D = 2 mg/mL ở 28°C trong điều kiện tối. Sau 7 ngày nuôi phục hồi, tất cả mô sẹo được chuyển sang môi trường chọn lọc I (ECM1) có chứa chất chọn lọc Glufosinate ở nồng độ 3 mg/L ở 28°C trong điều kiện tối 14 ngày. Để tăng cường áp lực chọn lọc, tiếp tục chuyển mô sẹo sang môi trường chọn lọc II (ECM2) với nồng độ chất chọn lọc cao gấp đôi (6 mg/L) ở 28°C trong tối 14 ngày. Các mô sẹo phôi hoá tạo thành trên môi trường ECM2, có màu vàng sáng được cấy chuyển sang môi trường tái sinh I (SEM1) có bổ sung chất chọn lọc với nồng độ tương tự ECM2 và nuôi trong tối 28°C, 2 tuần. Sau đó cấy chuyển tiếp sang môi trường tái sinh II (SEM2) không bổ sung chất chọn lọc để tái sinh chồi, nuôi trong điều kiện chiếu sáng 16 h/ngày ở 28°C. Cây chuyển gen tái sinh (có thân, lá) được cấy chuyển sang môi trường tạo cây hoàn thiện (RM - Môi trường ra rễ), nuôi trong điều kiện chiếu sáng 16 h/ngày ở 28°C. Khi cây tái sinh có 2 - 3 lá và 3 - 4 rễ được rửa sạch, trồng ra giá thể có nắp đậy kín trong 2 ngày và mở nắp trong 5 ngày. Cuối cùng, cây non được chuyển sang trồng trong chậu đất lớn trong điều kiện nhà kính đến khi thu hạt.

Các chỉ tiêu theo dõi:

- Tỷ lệ mẫu sống sót ở mỗi giai đoạn nuôi cấy (%) = (số mẫu sống sót sau mỗi giai đoạn/tổng số mẫu đưa vào nuôi cấy của mỗi giai đoạn) × 100%.

- Tỷ lệ tái sinh cây (%) = (số cây tái sinh/ tổng số phôi) × 100%

Tỷ lệ tạo cây hoàn thiện (%) = (số cây hoàn thiện/ số cây tái sinh) × 100%

2.2.6. Phân tích cây chỉnh sửa gen bằng PCR

Mẫu lá sau khi thu được sẽ bảo quản trong N₂ lỏng và lưu giữ ở - 80°C để sử dụng cho tách chiết DNA tổng số. DNA được tách chiết và tinh sạch theo phương pháp CTAB (Hoisington, 1992) có cải tiến cho phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm. Để kiểm tra sự có mặt của gen *Bar*, *Cas9* trong các cây chuyển gen, các mẫu DNA tổng số được sử dụng cho PCR với các cặp mồi đặc hiệu tương ứng (Bảng 1) bằng Kit EZ PCR Mix-Tracking Dye (Công ty sinh hóa Phù sa, Việt Nam) với thành phần phản ứng: EZ PCR Mix-Tracking dye và Buffer 2X : 25 µL, mỗi xuôi (10 µM): 1 µL, mỗi ngược (10 µM) : 1 µL, DNA tổng số: 2 µL, bổ sung H₂O cho đủ thể tích phản ứng 50 µL; theo chu trình: khởi động nóng 95°C 5 phút, 35 chu kỳ (biến tính 95°C 30 giây, gắn mồi 57°C 35 giây, kéo dài 72°C 90 giây), ổn định 72 °C 10 phút và giữ mẫu 4°C tùy thời gian. Sau khi PCR kết thúc, 10 µL dung dịch của mỗi phản ứng được sử dụng để điện di trên gel agarose 1% cùng với DNA marker (thang chuẩn). Sau đó, sản phẩm PCR được kiểm tra dưới đèn UV, chụp ảnh, đánh giá và tính toán hiệu quả biến nạp.

Bảng 1. Các cặp mồi sử dụng cho kiểm tra sự có mặt của các gen đích

STT	Tên mồi	Trình tự mồi (5'-3')	Kích thước (bp)
1	M-Bar-F	AAGCACGGTCAACTTCCGTA	20
2	M-Bar-R	GAAGTCCAGCTGCCAGAAAC	20
3	M-Cas9-F	CTACCATCTGCGGAAGAAGC	20
4	M-Cas9-R	CCAGGTCATCGTCGTATGTG	20

Hiệu quả biến nạp (%) = (Số cây dương tính với PCR với gen *Cas9*/Số phôi biến nạp) × 100%

2.2.7. Phương pháp bố trí thí nghiệm và xử lý số liệu

Mỗi thí nghiệm được thực hiện với tối thiểu 200 phôi đầu vào. Mỗi công thức thí nghiệm được lặp lại hoàn toàn ngẫu nhiên 3 lần. Các số liệu phân tích là số liệu trung bình cộng của các lần theo dõi. Các số liệu được tính toán bằng phần mềm EXCEL, phân tích và xử lý số liệu bằng phần mềm Minitab.

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 06 đến tháng 12 năm 2023 tại Bộ môn Kỹ thuật Di truyền, Viện Di truyền Nông nghiệp.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của tuổi phôi đến hiệu quả chuyển gen vào giống ngô K7 thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*

Ở Việt Nam, giống ngô thuần K7 được nhiều nhóm nghiên cứu sử dụng như giống ngô mô hình

cho nghiên cứu chuyển gen do một số ưu điểm: thời gian sinh trưởng trung bình, ít nhiễm sâu bệnh hại, là mẹ của một số tổ hợp lai triển vọng và có khả năng tái sinh tốt (Hà Hồng Hạnh và cs., 2020; Lưu Hàn Ly và cs., 2018; Huỳnh Thị Thu Huệ và cs., 2022). Do vậy, giống ngô K7 được sử dụng làm vật liệu để xây dựng quy trình cho chỉnh sửa vùng promoter của gen *ZmCLE7* bằng CRISPR/Cas9. Trước tiên, một số bước trong quá trình biến nạp được tiến hành tối ưu để phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm hiện có.

Bảng 2. Ảnh hưởng của tuổi phôi của giống ngô K7 đến hiệu quả chuyển gen

Công thức	Tuổi phôi ngô	Tỷ lệ phôi biểu hiện GUS (%)
1	7	10 ^c ± 3,33
2	9	18,89 ^b ± 1,93
3	11	28,89 ^a ± 1,93
4	13	15,56 ^b ± 3,85

Ghi chú: Số liệu trình bày trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần thí nghiệm. Các trung bình có các kí tự theo sau khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($\alpha = 0,05$).

Trong nghiên cứu của Phạm Thị Lý Thu và cộng sự (2014), phôi non ngô từ 7 - 13 ngày sau thụ phấn đã được sử dụng để chuyển nạp gen qua vi khuẩn *A. tumefaciens*. Nghiên cứu chỉ ra, tuổi phôi và kích thước phôi ảnh hưởng đáng kể đến hiệu quả biến nạp gen. Kết quả này phù hợp với kết quả nghiên cứu của Ishida và cộng sự (2007) cho thấy, tuổi phôi 9 - 12 ngày là lý tưởng cho quá trình chuyển gen tùy thuộc vào giống ngô. Do vậy trong nghiên cứu này, phôi non của giống ngô K7 ở các thời điểm 7, 9, 11, và 13 ngày sau thụ phấn được sử dụng cho thí nghiệm cho lây nhiễm với chủng khuẩn EHA105 tái tổ hợp có mang hệ thống cấu trúc pZY102:GUS. Kết quả ở bảng 2 và hình 2A cho thấy, các công thức thí nghiệm sử dụng phôi non ngô có tuổi khác nhau có biểu hiện hoạt tính GUS khác nhau. Cụ thể, tỷ lệ phôi biểu hiện hoạt tính GUS thấp nhất ở CT1 10% có xu hướng tăng dần ở CT2 và cao nhất ở CT3 với tuổi phôi là 11 ngày (28,89%). Tuy nhiên sang đến CT4 thì tỷ lệ phôi biểu hiện GUS lại giảm xuống còn 15,56%, điều này có thể là do tuổi phôi ở giai đoạn này có kích thước lớn và càng trưởng thành hơn dẫn tới khó tiếp nhận cấu trúc chuyển gen hơn so với phôi ở giai đoạn 9 - 11 ngày. Một số nghiên cứu trên thế giới đã chỉ ra, tuổi phôi ngô sử dụng cho biến nạp gen thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* trong khoảng 9 - 12 ngày tùy thuộc vào vật liệu di truyền của từng giống (Cody et

al., 2017; Ishida et al., 2007; Jones et al., 2019). Qua kết quả này, nhận thấy tuổi phôi của dòng ngô K7 là 11 ngày sau khi thụ phấn là thích hợp nhất cho biến nạp gen thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*. Do vậy, phôi ngô 11 ngày tuổi sau khi thụ phấn được sử dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.2. Ảnh hưởng của mật độ *A. tumefaciens* đến hiệu quả chuyển gen vào phôi non của giống ngô K7

Tiếp theo, để xác định mật độ vi khuẩn thích hợp cho chuyển nạp gen vào phôi non ngô của giống ngô K7, trong nghiên cứu này chúng tôi đã sử dụng nồng độ OD_{600nm} khác nhau để tiến hành thí nghiệm. Kết quả phân tích biểu hiện của gen chuyển *GUS* qua thí nghiệm nhuộm X-Gluc (Bảng 3 và hình 2B) cho thấy rằng mật độ vi khuẩn *A. tumefaciens* có ảnh hưởng đáng kể đến hiệu quả chuyển gen vào phôi non của giống ngô K7. Cụ thể, sau giai đoạn đồng nuôi cấy, sự khác biệt rõ rệt về mật độ vi khuẩn giữa các công thức thí nghiệm đã được ghi nhận. Tuy nhiên, mật độ vi khuẩn cao không đồng nghĩa với hiệu quả chuyển gen cao. Khi mật độ vi khuẩn (OD_{600nm}) tăng, số phôi biểu hiện hoạt tính *GUS* giảm dần, có khả năng do sự phát triển quá mức của vi khuẩn làm giảm sức sống của phôi, từ đó làm giảm hiệu quả chuyển gen.

Trong thí nghiệm, công thức CT3 với mật độ vi khuẩn OD_{600nm} = 0,5 đạt hiệu quả chuyển gen cao nhất, khác biệt rõ rệt với các công thức còn lại. Kết quả này gợi ý rằng mật độ OD_{600nm} = 0,5 là tối ưu để chuyển gen vào phôi non của giống ngô K7. Kết quả phù hợp với nghiên cứu trước đây của Nguyễn Văn Đông và cộng sự (2015), khi biến nạp gen *NF-YB2* vào một số dòng ngô Việt Nam với mật độ vi khuẩn từ 0,5 đến 1, cũng như các nghiên cứu quốc tế như Hoerster và cộng sự (2020) và Kang và cộng sự (2022), sử dụng mật độ vi khuẩn trong khoảng OD_{600nm} = 0,5 để đạt hiệu quả biến nạp gen cao.

Bảng 3. Ảnh hưởng của mật độ *A. tumefaciens* đến hiệu quả chuyển gen

Công thức	OD _{600nm}	Tỷ lệ phôi biểu hiện GUS (%)
1	0	0
2	0,25	4,44 ^c ± 1,93
3	0,5	22,22 ^a ± 1,93
4	0,75	13,33 ^b ± 3,33
5	1	5,56 ^c ± 1,93

Ghi chú: Số liệu trình bày trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần thí nghiệm. Các trung bình có các kí tự theo sau khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($\alpha = 0,05$).

Việc tối ưu hóa mật độ vi khuẩn nên được kết hợp với các yếu tố khác như thời gian lây nhiễm và đồng nuôi cấy để tăng tỷ lệ biểu hiện gen và sức sống của phôi. Mật độ vi khuẩn được chọn ($OD_{600nm} = 0,5$) sẽ được áp dụng cho các thí nghiệm tiếp theo nhằm đảm bảo tính nhất quán và hiệu quả cao trong nghiên cứu.

3.3. Ảnh hưởng của thời gian lây nhiễm đến hiệu quả chuyển gen vào phôi non ngô của giống K7 thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*

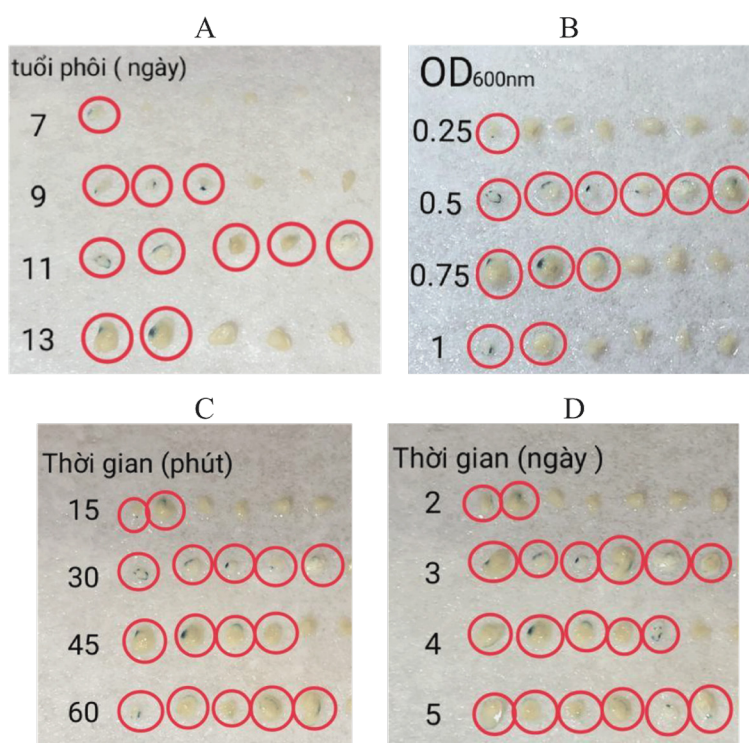
Để xác định được thời gian lây nhiễm đạt hiệu quả cao nhất với giống ngô K7 chúng tôi tiến hành thí nghiệm đánh giá ảnh hưởng của thời gian lây nhiễm đến hiệu quả chuyển gen với các công thức

khác nhau. Kết quả thí nghiệm (Bảng 4 và Hình 2C) cho thấy tỷ lệ biểu hiện gen chuyển *GUS* thông qua nhuộm X-Gluc thấp nhất ở công thức lây nhiễm 15 phút (trung bình 8,89%). Ở các công thức lây nhiễm 30, 45 và 60 phút, tỷ lệ biểu hiện *GUS* tăng cao và tương đương nhau, trung bình từ 17% đến 20%. Dựa trên hiệu quả tương tự nhưng yêu cầu tối ưu hóa thời gian, công thức 30 phút được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo. Kết quả này thống nhất với một số nghiên cứu trước đây cho thấy thời gian lây nhiễm khoảng 30 phút là thích hợp cho chuyển gen vào phôi non (Nguyễn Văn Đồng và cs., 2015; Ishida *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2022).

Bảng 4. Ảnh hưởng của thời gian lây nhiễm đến hiệu quả chuyển gen

Công thức	Thời gian lây nhiễm (phút)	Tỷ lệ phôi biểu hiện <i>GUS</i> (%)
1	0	0
2	15	8,89 ^b ± 3,85
3	30	20,00 ^a ± 3,33
4	45	17,78 ^a ± 3,85
5	60	18,89 ^a ± 1,93

Ghi chú: Số liệu trình bày trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần thí nghiệm. Các trung bình có các kí tự theo sau khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($\alpha = 0,05$).



Hình 2. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của một số yếu tố đến hiệu quả chuyển gen vào phôi non của giống ngô K7

Chú thích: A, Biểu hiện của gen *GUS* ở phôi non tại các thời điểm sau phụ phấn; B, Biểu hiện của gen *GUS* ở phôi non với các nồng độ *A. tumefaciens* lây nhiễm khác nhau; C, Biểu hiện của gen *GUS* ở phôi non với các thời gian lây nhiễm khuẩn *A. tumefaciens*; D, Biểu hiện của gen *GUS* ở phôi non tại các thời điểm đồng nuôi cấy khác nhau. Vòng tròn màu đỏ thể hiện các phôi biểu hiện hoạt tính *GUS*.

3.4. Ảnh hưởng của thời gian đồng nuôi cấy đến hiệu quả chuyển gen vào phôi non của giống ngô K7 thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*

Để đánh giá ảnh hưởng của thời gian đồng nuôi cấy đến hiệu quả chuyển gen, các thí nghiệm lây nhiễm phôi ngô ở nồng độ khuẩn OD_{600nm} = 0,5 và thời gian lây nhiễm 30 phút được thực hiện, sau đó đem đồng nuôi cấy trong môi trường CCM được thực hiện với các công thức thời gian lần lượt 1 ngày, 2 ngày, 3 ngày, 4 ngày và 5 ngày. Kết quả phân tích biểu hiện của gen chuyển *GUS* bằng thí nghiệm nhuộm X-Gluc đã gợi ý rằng thời gian đồng nuôi cấy có tác động đến hiệu quả chuyển gen vào phôi ngô của các giống ngô thí nghiệm. Số phôi ngô biểu hiện hoạt tính *GUS* ở CT2 là 10% và tăng lên 20% ở công thức 3. Từ CT3 đến CT5 có cùng một mức ý nghĩa, tỷ lệ phôi biểu hiện tương đương nhau khoảng 20% - 21,11%. Ngoài ra, phôi ngô ở CT1, CT2 và CT3 có màu vàng nhạt, sáng màu hơn so với phôi ở các CT4 và CT5 phôi ngô có biểu hiện bị hóa vàng nâu ở bề mặt ngoài (Bảng 5; Hình 2D). Dựa trên hiệu quả tương tự nhưng yêu cầu tối ưu hóa thời gian, công thức 3 ngày đồng nuôi cấy được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo. Hầu hết các nghiên cứu khi chuyển gen vào phôi non ngô đều cho thấy thời gian đồng nuôi cấy 3 ngày giống như kết quả nghiên cứu của Nguyễn Văn Đồng và cộng sự (2015); Ishida và cộng sự (2007); Gu và cộng sự (2021).

Công thức này sẽ được thực hiện ở những thí nghiệm tiếp theo.

Bảng 5. Ảnh hưởng của thời gian lây nhiễm đến hiệu quả chuyển gen

Công thức	Thời gian đồng nuôi cấy (ngày)	Tỷ lệ phôi biểu hiện <i>GUS</i> (%)
1	1	0
2	2	10,00 ^b ± 3,33
3	3	21,11 ^a ± 1,93
4	4	20,00 ^a ± 3,33
5	5	21,11 ^a ± 3,85

Ghi chú: Số liệu trình bày trong bảng là giá trị trung bình của 3 lần thí nghiệm. Các trung bình có các kí tự theo sau khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa thống kê ($\alpha = 0,05$).

3.5. Kết quả chuyển nạp cấu trúc CRISPR/Cas9 cho chỉnh sửa vùng promoter của gen *ZmCLE7* vào giống ngô K7

Với các thử nghiệm đã nêu trên, các bước phù hợp được lựa chọn để chuyển nạp cấu trúc CRISPR/Cas9 mang các sgRNA cho chỉnh sửa vùng promoter của gen *ZmCLE7* vào giống ngô K7 thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* để thu được các cây chỉnh sửa gen nhằm phục vụ cho các thí nghiệm tiếp theo. Trong quá trình tiến hành chuyển cấu trúc CRISPR/Cas9 mang các sgRNA cho chỉnh sửa vùng promoter của gen *ZmCLE7* cũng được tiến hành song song cùng thí nghiệm chuyển cấu trúc vector pZY102 mang gen *GUS* (Bảng 6; Hình 3).

Bảng 6. Tỷ lệ mẫu sống sót qua các giai đoạn chuyển gen

Giai đoạn	Số mẫu sống sót và phát triển qua các giai đoạn			
	<i>pCas9/sgRNA-CLE7pro</i>	Tỷ lệ (%)	<i>PZY102:GUS</i>	Tỷ lệ (%)
Phôi	200	100	200	100
Đồng nuôi cấy (CCM)	199	99,5	199	99,5
Phục hồi (ReM)	195	97,99	198	99,5
Chọn lọc 1 (ECM1)	112	57,44	117	59
Chọn lọc 2 (ECM2)	59	52,68	64	54,7
Tái sinh (SEM1)	37	62,71	41	64,06
Tái sinh chồi (SEM2)	15	40,5	18	43,9
Tái sinh rễ (RM)	11	73,33	15	83,33
Cây sống sót trên giá thể	6	54	9	60
Cây sống sót trong chậu đất	2	33,33	4	40

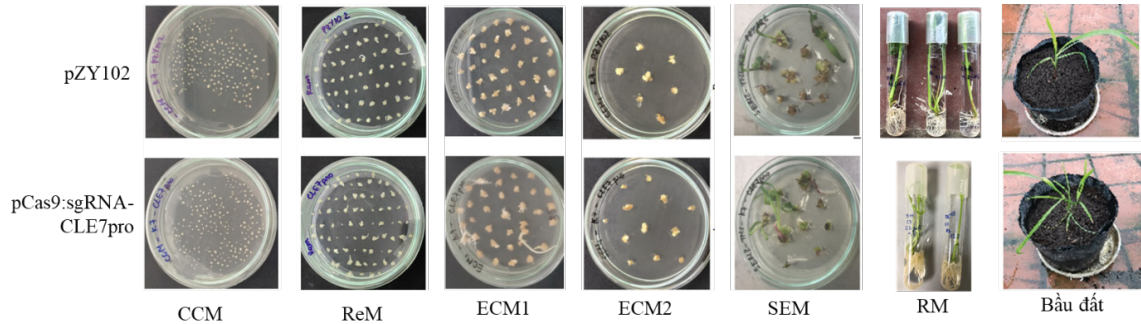
Ghi chú: Tỷ lệ % mẫu sống sót ở mỗi giai đoạn nuôi cấy được tính theo công thức: (số mẫu sống sót sau mỗi giai đoạn/tổng số mẫu đưa vào nuôi cấy của mỗi giai đoạn) × 100%.

Kết quả bảng 6 cho thấy, mỗi cấu trúc sử dụng khoảng 200 phôi để tiến hành chuyển gen với cả 2 loại cấu trúc và thu nhận như sau: Tỷ lệ phôi sống sót và phát triển ở môi trường đồng nuôi cấy CCM và môi trường nuôi cấy phục hồi ReM của 2 cấu trúc cao > 97%. Sang giai đoạn chọn lọc mô sẹo chuyển gen tỷ lệ mô sẹo sống sót giảm rõ rệt, môi trường chọn lọc 1

cấu trúc *pCas9/sgRNA-CLE7pro* giảm còn 57,44% và cấu trúc *PZY102* giảm còn 59%, môi trường chọn lọc 2 tiếp tục giảm còn lần lượt là 52,68% và 54,7%. Giai đoạn tái sinh chồi sau 4 tuần, số mô sẹo chuyển từ màu vàng nhạt đặc trưng của mô sẹo sang màu xanh lá non đạt tỷ lệ 62,71% và 64,06. Tuy nhiên, trong đó có rất ít số mô sẹo có thể tái sinh chồi thành công, tỷ

lệ xuất hiện chồi đạt 40,5% và 43,9%. Quan sát sau 2 tuần cho thấy >73% số chồi hình thành bộ rễ đầy đủ. Như vậy, các cây ngô K7 tái sinh từ mô sẹo được chuyển cấu trúc pCas9/sgRNA-CLE7pro và PZY102 đã được tạo ra thành công. Hiệu suất tái sinh đạt trung bình 5,5% và 7,5% tính trên tổng số phôi ban

đầu. Đưa cây tái sinh từ điều kiện nuôi cấy *in vitro* ra giá thể và chậu đất cho thấy tỷ lệ cây hoàn thiện tương đối không cao, lần lượt là 33,33% (cấu trúc pCas9/sgRNA-CLE7pro) và 40% (cấu trúc PZY102). Kết quả này cho thấy các thí nghiệm chuyển gen vào cây ngô K7 với tỷ lệ thành công khá thấp.



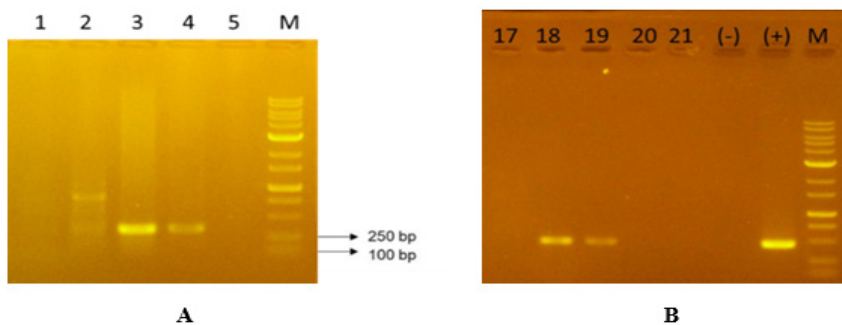
Hình 3. Các bước chuyển nạp cấu trúc CRISPR/Cas9 cho chỉnh sửa vùng promoter của gen *ZmLE7* và cấu trúc PZY102 vào giống ngô K7

Chú thích: CCM, môi trường đông nuôi cấy; ReM, môi trường phục hồi; ECM1-ECM2, môi trường tạo callus có bổ sung glufosinate; SEM, môi trường tạo chồi và kéo dài chồi; RM, môi trường ra rễ.

3.6. Kết quả đánh giá hiệu quả chuyển nạp cấu trúc chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 vào giống ngô K7 bằng PCR

Sau kết quả biến nạp, 15 mẫu cây chuyển cấu trúc chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 và cấu trúc chuyển gen PZY102 ở giai đoạn giá thể được thu nhận, tuy nhiên chỉ thu nhận được 6 cây còn sống khi chuyển ra đất. Các cây được trồng và chăm sóc trong nhà lưới 10 - 14 ngày thì thu mẫu lá để sử dụng cho tách chiết DNA tổng số. Lá của 6 mẫu từ 6 dòng riêng biệt (2 cây của cấu trúc CRISPR/Cas9 cho chỉnh sửa promoter của gen *ZmCLE7* và 4 cây của cấu trúc PZY102) được sử dụng cho tách chiết DNA tổng số cùng với các mẫu lá của cây đối chứng không chuyển gen K7 theo phương pháp trình bày trên. Kết quả điện di và đo nanodrop cho thấy chất lượng DNA tổng số sau khi tách từ các dòng chuyển/chỉnh sửa gen *ZmCLE7* tốt, có độ tinh sạch cao, đảm bảo chất lượng cho phân tích PCR.

Các mẫu DNA tổng số tiếp tục được sử dụng để kiểm tra sự có mặt của gen *Cas9* đối với cấu trúc CRISPR/Cas9 cho chỉnh sửa promoter của gen *ZmCLE7* và gen *Bar* đối với cấu trúc PZY102 trong các cây T_0 bằng PCR như trình bày ở hình 4. Kết quả PCR kiểm tra sự có mặt của gen *Cas9* ở 2 cây ngô chỉnh sửa vùng promoter của gen *ZmCLE7* thấy chỉ có 1 cây dương tính với cấu trúc pCas9/sgRNA-CLE7pro. Kết quả PCR kiểm tra sự có mặt của gen *Bar* ở 4 cây ngô chuyển gen thấy có 2 cây dương tính cấu trúc pZY102. Qua kết quả PCR gen *Cas9* và *Bar* từ các cây T_0 cho thấy, giống ngô K7 đều có khả năng tiếp nhận cấu trúc chuyển/chỉnh sửa gen nhưng hiệu quả biến nạp chưa được cao < 1%. Do vậy, để nâng cao hiệu quả chuyển gen thì cần tối ưu hoàn thiện một số bước để phù hợp hơn với điều kiện phòng thí nghiệm.



Hình 4. Kết quả kiểm tra sự có mặt của gen chuyển/ chỉnh sửa gen ở các cây ngô T_0

Ghi chú: A: Sự có mặt của gen *Cas9* ở các cây ngô T_0 sau khi chuyển cấu trúc chứa sgRNA- *ZmCLE7*. Ghi chú: (1) cây đối chứng không chuyển gen giống K7; (2,3) các dòng ngô T_0 chuyển cấu trúc pCAS9/sgRNA-CLE7pro; (4) plasmid của của pCas9/sgRNA-CLE7pro; (5) H_2O ; M: CSI-MDNA-1KBPLUS; B: Sự có mặt của gen *Bar* ở các cây ngô T_0 sau khi chuyển cấu trúc pZY102. Ghi chú: 17-20: các dòng ngô T_0 chuyển cấu trúc PZY10; 21: cây đối chứng không chuyển gen giống K7; (-) H_2O ; (+): plasmid của cấu trúc pZY102; M: CSI-MDNA-1KBPLUS.

IV. KẾT LUẬN

Xây dựng được quy trình chuyển cấu trúc CRISPR/Cas9 qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* vào phôi non của giống ngô K7. Quy trình này bao gồm các bước xử lý cụ thể từ lây nhiễm vi khuẩn, nuôi cấy trên các môi trường chọn lọc và phát triển, đến việc tạo cây hoàn chỉnh. Kết quả phân tích PCR cho thấy khả năng chuyển gen thành công với cây mang gen *Cas9* và gen *Bar*. Những kết quả này cung cấp cơ sở quan trọng để ứng dụng công nghệ CRISPR/Cas9 trong chỉnh sửa gen, hướng tới việc cải thiện năng suất, chất lượng, và khả năng chống chịu của cây ngô đối với điều kiện bất lợi và sâu bệnh.

LỜI CẢM ƠN

Đây là một phần kết quả nghiên cứu của đề tài “Nghiên cứu ứng dụng công nghệ chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 làm tăng số hàng hạt của giống ngô Việt Nam” thuộc Chương trình: Đề án phát triển công nghiệp sinh học ngành nông nghiệp đến năm 2030, do Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn quản lý.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Hà Hồng Hạnh, Hoàng Thị Thu Yến, Huỳnh Thị Thu Huệ, 2020. Nghiên cứu biến nạp và xác định sự có mặt của gen mã hóa yếu tố phiên mã *ZmZIP72* ở cây ngô thể hệ T0. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Thái Nguyên*, 225 (08): 50-56.

Huỳnh thị Thu Huệ, Nguyễn Thùy Linh, Đinh Trường Sơn, 2022. Đánh giá sự duy trì và biểu hiện gen *ZmLEA14A* ở cây ngô chuyển gen. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Đại học Thái Nguyên*, 227 (14): 78-84.

Lưu Hàn Ly, Lê Thị Thu Hiền, Nguyễn Xuân Thắng, Huỳnh Thị Thu Huệ, 2018. Nghiên cứu chuyển gen mã hóa manitol 1-phosphate dehydrogenase (*mtlD*) vào cây ngô. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 60 (9): 59-64.

Nguyễn Văn Đồng, Phạm Thị Lý Thu, Lê Thị Mai Hương, Phạm Thị Hương, Lê Thị Lan, Nguyễn Chiến Hữu, Nguyễn Hữu Kiên, Trần Duy Hưng, Lê Huy Hàm, 2015. Nghiên cứu chuyển gen chịu hạn *NF-YB2* vào một số dòng ngô Việt Nam. *Tạp chí Nông nghiệp & Phát triển Nông thôn*, 7: 25-30.

Phạm Thị Lý Thu, Lê Thị Mai Hương, Phạm Thị Hương, Nguyễn Văn Đồng, Lê Huy Hàm, 2014. Cải thiện hiệu quả chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* của một số dòng ngô Việt Nam. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 7 (53): 3-9.

Ngô Hữu Tình, 2009. *Chọn lọc và lai tạo giống ngô*. NXB Nông nghiệp, Hà Nội.

Tổng cục Hải quan, 2023. Thống kê hải quan về hàng hóa xuất nhập khẩu Việt Nam.

Cody J. P., Graham N. D., Birchler J. A., 2017. BiBAC modification and stable transfer into Maize (*Zea mays*) Hi-II immature embryos via *agrobacterium*-mediated transformation. *Current Protocol in Plant Biology*, 2 (4): 350-369.

FAO, 2023. Food Outlook – Biannual report on global food markets. Rome. <https://doi.org/10.4060/cc3020en>.

Hoerster G., Wang N., Ryan L., Wu E., Anand A., McBride K., Lowe K., Jones T. & Gordon-Kamm B., 2020. Use of non-integrating Zm-Wus2 vectors to enhance maize transformation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 56 (3): 265-279.

Hoisington D., 1992. Laboratory protocol. CIMMYT applied molecular genetics laboratory, CIMMYT. Mexico, D.F., CIMMYT.

Gu Y., Chen X., Song R. & Qi W., 2021. Establishment of a Bivector Genetic Transformation System in Recalcitrant Maize Inbred Lines. *Agriculture*, 11 (7): 663.

Ishida Y., Hiei Y., Komari T., 2007. *Agrobacterium*-mediated transformation of maize. *Nature Protocols*, 2 (7): 1614-1621.

Jia H., Wang N., 2014. Targeted genome editing of sweet orange using Cas9/sgRNA. *PLoS One*, 9 (4): e93806.

Jones T., Lowe K., Hoerster G., Anand A., Wu E., Wang N., Arling M., Lenderts B., Gordon-Kamm W., 2019. Maize transformation using the Morphogenic Genes *Baby Boom* and *Wuschel2*. *Transgenic Plants: Methods in Molecular Biology*, 1864: 81-93.

Kang M., Lee K., Finley T., Chappell H., Veena V., Wang K., 2022. An improved *agrobacterium*-mediated transformation and genome-editing method for maize inbred B104 using a ternary vector system and immature embryos. *Frontiers in Plant Science*, 13.

Kim K., Franceschi V. R., Davin L. B., and Lewis N. G., 2006. β -Glucuronidase as reporter gene: advantages and limitations. *Arabidopsis Protocols*, p. 263-274.

Liu L., Gallagher J., Arevalo E. D., Chen R., Skopelitis T., Wu Q., Bartlett M., Jackson D., 2021. Enhancing grain-yield-related traits by CRISPR-Cas9 promoter editing of maize *CLE* genes. *Nature Plants*, 7 (3): 287-294.

Ran F. A. F. A., Hsu P. D., Wright J., Agarwala V., Scott D. A., Zhang F., 2013. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, 8 (11): 2281-2308.

Wang Y., Tang Q., Pu L., Zhang H. & Li X., 2023. CRISPR-Cas technology opens a new era for the creation of novel maize germplasms. *Frontiers in Plant Science*, 13: 1049803.

Introducing the CRISPR/Cas9 construct into maize variety K7 for editing the promoter region of the ZmCLE7 gene

Nguyen Huu Kien, Nguyen Thi Hiep, Nguyen Thi Ngoc Minh, Nguyen Thi Lieu, Khuat Huu Trung, Do Tien Phat, Doan Thi Bich Thao, Nguyen Le Trang

Abstract

The CRISPR/Cas9 gene-editing technology is a significant breakthrough in biology and agriculture, enabling precise modifications at any location within the genome and offering potential improvements to the biological traits of crops. However, the efficiency of applying this technology in crops, particularly maize, depends on various factors such as bacterial strain, bacterial density, and culture conditions. This study focuses on optimizing the gene transfer process into immature embryos of the K7 maize variety using *Agrobacterium tumefaciens* carrying the PZY102:GUS construct, providing a foundation for editing the promoter region of the *ZmCLE7* gene with CRISPR/Cas9. The process involves infecting embryos 11 days after pollination with a bacterial solution (OD600 = 0.5) for 30 minutes, culturing on CCM medium for 3 days, then transferring to ECM1 medium supplemented with 2 mg/L 2,4-D and 3 mg/L of the selective agent glufosinate for 14 days. Subsequently, the embryos are cultured on ECM2 medium with 6 mg/L glufosinate for 14 days, followed by SEM1, SEM2, and finally RM medium to develop complete plants. PCR analysis of six surviving plants revealed that one plant contained the Cas9 gene and two plants carried the Bar gene, demonstrating the successful integration of the CRISPR/Cas9 construct into the K7 maize variety. This research establishes an essential foundation for applying CRISPR/Cas9 technology to enhance yield, quality, and resistance to adverse conditions in maize.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*, CRISPR/Cas9, gene editing, PCR, *Zea mays* L.

Ngày nhận bài: 23/7/2024

Người phản biện: TS. Huỳnh Thị Thu Huệ

Ngày phản biện: 12/11/2024

Ngày duyệt đăng: 06/12/2024

THIẾT KẾ CẤU TRÚC CRISPR/CAS9 BẮT HOẠT GEN *SBEIIb* Ở LÚA BẮC THƠM 7

Phùng Thị Thu Hương¹, Nguyễn Hữu Kiên¹, Cao Lệ Quyên¹, Phạm Xuân Hội¹, Nguyễn Duy Phương^{1*}

TÓM TẮT

Ngũ cốc có hàm lượng amylose (Amylose Content-AC) và tinh bột kháng (Resistant Starch-RS) cao mang lại những lợi ích tiềm năng cho sức khỏe con người. Gen *SBEIIb* (Starch Branching Enzyme IIb) biểu hiện chủ yếu ở hạt lúa, tham gia vào quá trình sinh tổng hợp amylopectin trong nội nhũ hạt, được xác định có vai trò quan trọng trong việc xác định cấu trúc mịn và các đặc tính vật lý của tinh bột. Trong nghiên cứu này, đoạn gen *SBEIIb* đã được phân lập từ DNA tổng số của giống lúa chủ lực Bắc Thơm 7 (BT7). Dựa trên kết quả giải trình tự đoạn gen *SBEIIb*, trình tự crARN đã được thiết kế và chèn vào vị trí BsaI trên vector trung gian pENTR4. Toàn bộ cấu trúc biểu hiện sgRNA (single guide ARN) nhận biết đặc hiệu *SBEIIb* đã được đưa vào vector chuyển gen thực vật pCas9 để tạo ra hệ thống CRISPR/Cas9 bất hoạt gen đích. Nghiên cứu này là cơ sở cho việc tạo ra giống lúa BT7 có AC cao bằng công nghệ chỉnh sửa gen ở Việt Nam.

Từ khóa: Chỉnh sửa gen, giống lúa Bắc thơm 7, hàm lượng amylose, CRISPR/CAS9

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Amylose là một trong hai thành phần tinh bột chính trong hạt gạo, không được tiêu hóa trong dạ dày hoặc ruột non mà đi thẳng đến ruột già. Việc sử dụng gạo có AC cao giúp cải thiện sức khỏe con người, làm giảm nguy cơ mắc các bệnh tim mạch, tiểu đường và một số bệnh như ung thư ruột kết và

trực tràng... Ngoài ra, giống lúa có AC trong hạt gạo cao có hàm lượng tinh bột dễ tiêu (amylopectin) thấp, phù hợp với những người đang ở chế độ ăn kiêng. Sử dụng gạo có AC cao đang trở thành một xu hướng của xã hội hiện đại, đặc biệt là các loại gạo có mùi thơm (Regina *et al.*, 2006; Sun *et al.*, 2017). Chính vì vậy, nghiên cứu cải tiến tăng AC cho các

¹ Viện Di truyền Nông nghiệp

* Tác giả liên hệ, email: phuongnd.bio@gmail.com