

## CHUYỂN GEN *GNA* KHÁNG RẦY RỆP VÀO CÂY BÔNG VẢI BẰNG VI KHUẨN *Agrobacterium tumefaciens*

Phạm Đức Trí\*, Hoàng Văn Dương, Lê Tấn Đức,  
Phan Tường Lộc, Mai Trường, Nguyễn Hữu Hồ

*Viện Sinh học Nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

Email\*: phamductri75@gmail.com

Ngày gửi bài: 05.01.2015

Ngày chấp nhận: 22.07.2015

### TÓM TẮT

Trong nghiên cứu chuyển gen *GNA* (*Galanthus nivalis agglutinin*) vào cây bông vải giống Coker 312, trụ mầm bông vải *in vitro* sau khi xử lý với vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* dòng EHA 105 mang gen *GNA* điều khiển bởi promoter RSs1 được chọn lọc trên môi trường phát sinh mô sẹo bổ sung 50 mg/l kanamycin. Mô sẹo kháng kháng sinh hình thành từ trụ mầm được chuyển sang môi trường tạo mô sẹo có khả năng sinh phôi, rồi tiếp tục chuyển sang môi trường phát sinh phôi và cuối cùng là môi trường nảy chồi phôi. Cây bông vải chuyển gen được hình thành từ những phôi này. Những dòng cây chuyển gen được minh chứng bằng kỹ thuật PCR và Southern blot. Gen *GNA* biểu hiện tốt trong cây chuyển gen khi đánh giá bằng kỹ thuật Western blot.

Từ khóa: *Agrobacterium tumefaciens*, cây bông Coker 312, chuyển gen, gen *GNA*.

### Insect Resistance Gene (*GNA*) Transformation into Cotton by *Agrobacterium tumefaciens*

#### ABSTRACT

Hypocotyl explants of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) cv. Coker 312 were transformed with *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA 105 containing the *GNA* gene under the control of RSs1 promoter and selected on callus initiation medium containing kanamycin. Somatic embryogenesis was promoted in the surviving calli. Plantlets were recovered from putative transgenic embryos. Polymerase Chain Reaction (PCR) and Southern blot analysis were used to confirm the integration of *GNA* transgene into the plant genome. Western blot result indicated the expression of the *GNA* gene in transgenic cotton plants.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*, Cotton Coker 312, genetic transformation, *GNA* gene.

#### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Hiện nay, các giống bông vải của Việt Nam kháng rầy rệp yếu nên có năng suất thấp. Nguyên do bọ rầy xanh (*Amrasca biguttula*) chích hút nhựa cây làm cho lá bị xoắn, mép lá cong lại, chuyển màu vàng rồi khô, cây phát triển kém, chất lượng bông xơ giảm. Cây bông non trong 3 - 4 tuần lễ đầu thường bị hại nặng hơn cây lớn, toàn bộ lá có thể khô cháy. Trên cây lớn quả bông bị rụng non, giảm năng suất đáng kể. Rệp bông (*Aphis gossypii*) trưởng thành không

cánh và rệp non bám ở mặt dưới lá, trên chồi non, hoa và quả non chích hút nhựa làm lá xoắn, ngọn chùn lại, cây non không phát triển được, nụ hoa bị rụng, năng suất giảm. Rệp phá hại nặng thời kỳ cây còn nhỏ. Nếu mật độ rệp cao vào cuối vụ khi bông nở, chất thải của rệp là môi trường cho nấm bồ hóng phát triển làm xơ bông bị đen bẩn và dính bết lại, chất lượng xơ giảm, trở ngại cho việc kéo sợi. Ngoài ra, rệp còn là vật trung gian truyền virus gây bệnh xanh lùn, một bệnh rất nguy hiểm ở bông.

Nghiên cứu biến nạp gen *Galanthus nivalisagglutinin* (GNA) vào cây bông vải tạo giống bông vải kháng rầy rệp, đồng thời hạn chế sự lây nhiễm của virus xanh lùn vào cây bông vải, do tác động của protein GNA tạo ra trong cây bông vải chuyển gen. Những côn trùng cắn phá và chích hút chỉ có thể sử dụng amino acid tự do trong nhựa luyện ở thực vật như một nguồn cung cấp chất đạm. Theo Gatehouse et al. (1995) và Sauvion et al. (1996), cơ chế hoạt động của protein GNA trong ruột côn trùng là chúng kết hợp với đường mannose tạo thành phức hợp glycoprotein. Khi nối các phức hợp đường trên màng ruột dẫn đến ngăn cản sự hấp thu chất dinh dưỡng. Bên cạnh đó, sự kích thích nhập bào của lectin và các chất độc hay các độc tố vi khuẩn khác làm phá vỡ tế bào.

Protein GNA cùng với hai lectin khác *Narcissus pseudonarcissus* (NPA) và *Allium sativum* (ASA) được thử nghiệm độc tính và khả năng ức chế sự phát triển ấu trùng rệp hại khoai tây (*Myzus persicae*). Kết quả cho thấy độc lực của GNA mạnh nhất, với tỉ lệ gây chết ấu trùng là 42% ở nồng độ 1.500 µg/ml và liều gây độc IC<sub>50</sub> (half maximal inhibitory concentration) là 630 µg/ml. Trong khi đó, NPA và ASA không gây độc ở nồng độ từ 10 - 1.500 µg/ml. Kết quả thử nghiệm cho biết GNA không tác động đáng kể lên rệp khoai tây trưởng thành, nhưng tác động lên sự sinh sản và các giai đoạn phát triển của rệp (Sauvion et al., 1996).

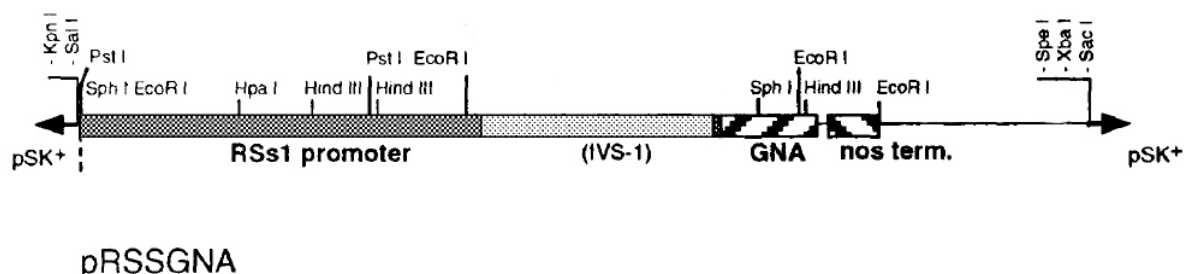
## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1. Cấu trúc vector tái tổ hợp

Cấu trúc vector tái tổ hợp mang gen GNA bằng cách xử lý plasmid pSK<sup>+</sup>-RSs1.GNA (Hình 1) (Rao et al., 1998) và plasmid pCAMBIA2301 bằng hai enzyme KpnI và SacI rồi kết nối bằng T4 DNA ligase. Biến nạp vector tái tổ hợp vào trong vi khuẩn *E. coli*. Dùng QIAGEN Plasmid Midi kit tách chiết số lượng lớn và kiểm tra plasmid tái tổ hợp từ những dòng *E.coli* chuyển gen. Biến nạp plasmid tái tổ hợp vào *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 và dùng dòng vi khuẩn này để chuyển gen.

### 2.2. Tạo cây bông vải *in vitro*

Loại lớp bông bên ngoài hạt bông vải bằng cách lác với acid H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> đậm đặc trong khoảng 10 - 15 phút, rửa sạch acid 5 lần bằng nước vô trùng. Hạt sau xử lý được khử trùng bằng cồn 70% trong 2 phút. Để xác định nồng độ clor trong nước Javel và thời gian khử trùng tốt nhất, tiếp tục khử trùng hạt với nước Javel có nồng độ clor 2% hoặc 2,5% (w/v) từ 10 - 50 phút cùng với 1 - 2 giọt Tween 20. Rửa nước 5 lần trước khi thấm khô, bóc lớp vỏ cứng và cấy vào bình tam giác chứa môi trường 1/2 MS (Murashige and Skoog 1962) vitamin B5, 2% glucose, 0,3% gelrite, chỉnh pH môi trường 6,8 trước khi hấp vô trùng. Đặt trong tối cho đến khi hạt nảy mầm. Hạt nảy mầm đặt trong điều kiện chiếu sáng 3.000lux, 10 h/ngày. Trụ mầm của hạt bông vải giống Coker 312 sau khi nảy mầm *in vitro* từ 7 - 10 ngày được dùng làm vật liệu chuyển gen. Mỗi nghiệm thức khử trùng dùng 20 hạt bông vải và thí nghiệm lặp lại 3 lần.



Hình 1. Plasmid pSK<sup>+</sup>-RSs1.GNA

### 2.3. Chuyển gen *GNA* vào cây bông vải

Chuyển gen vào trụ mầm bông vải bằng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* theo phương pháp của Bayley et al. (1992), Wilkins et al. (2004) và Wu et al. (2008).

Một ngày trước chuyển gen, vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* được nuôi lắc qua đêm trong 20ml môi trường lỏng AB có bổ sung 50 mg/l kanamycin và 50 mg/l rifamycin. Đo OD<sub>600</sub> dịch vi khuẩn đạt 0,6 rồi ly tâm thu sinh khối vi khuẩn ở 5.000 vòng/phút trong 5 phút. Trộn đều sinh khối vi khuẩn trong 20ml môi trường MS để dùng chuyển gen.

Những đoạn trụ mầm có chiều dài 0,5cm sau xử lý với vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* trong 15 phút được cấy trên đĩa môi trường nuôi chung có khoáng MS vitamin B5; 0,1 mg/l 2,4D; 0,1 mg/l Kn, 0,75 g/l MgCl<sub>2</sub>, 3% glucose, 0,3% gelrite và bổ sung 100 µM/ acetosyringone. Ủ các đĩa này tối ở nhiệt độ 24°C trong 2 ngày. Mẫu chuyển gen sau khi rửa sạch vi khuẩn với nước vô trùng có bổ sung 500mg/l cefotaxime được cấy lên môi trường chọn lọc tạo mô sẹo có khoáng MS, vitamin B5; 0,1 mg/l 2,4D; 0,1 mg/l Kn; 0,75 g/l MgCl<sub>2</sub>, 3% glucose, 0,3% gelrite bổ sung 50 mg/l kanamycin và 500 mg/l cefotaxime. Đặt mẫu ở điều kiện chiếu sáng 3.000lux với thời gian 10 h/ngày

Sau 2-3 lần chọn lọc trên môi trường tạo mô sẹo, mô sẹo kháng kháng sinh hình thành trên môi trường chọn lọc được chuyển sang môi trường tạo mô sẹo có khả năng sinh phôi gồm khoáng MS vitamin B5; 0,5 mg/l IBA; 0,15 mg/l Kn; 3% glucose; 0,3% gelrite bổ sung 50 mg/l kanamycin và 500 mg/l cefotaxime. Kiểm tra mô sẹo kháng kanamycin bằng nhuộm GUS và PCR. Sau hai lần cấy khoảng 6 - 8 tuần, chuyển mô sẹo sang môi trường tạo phôi có khoáng MS vitamin B5; 0,75 g/l MgCl<sub>2</sub>; 1,9 g/l KNO<sub>3</sub>; 3% glucose; 0,3% gelrite bổ sung 25 mg/l kanamycin. Phôi nảy mầm trên môi trường khoáng MS không có NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> vitamin B5; 0,1 mg/l Zeatin; 3% (w/v) glucose; 0,3% (w/v) gelrite. Cây bông vải cấy trên môi trường MS; 3% sucrose; 1% agar; 10% (v/v) nước dừa.

### 2.4. Kiểm tra mô và cây chuyển gen

Những dòng bông vải kháng kanamycin được tách chiết DNA tổng số bằng phương pháp của Li và đồng tác giả (2001). DNA này là nguyên liệu để thực hiện các kiểm tra cây chuyển gen bằng PCR và Southern blot.

#### *Phân tích DNA cây bông vải chuyển gen GNA bằng PCR*

Kiểm tra sự hiện diện của gen *GNA* trong cây bông vải chuyển gen bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu tham khảo, tác giả McCafferty et al. (2008), khuếch đại đoạn DNA 500bp. Mồi 1: 5'- ATGGCTAAGGCAAGTCTCCTC - 3' và mồi 2: 5'- TCATTACTTTGCCGTCACAAG - 3'. Chương trình nhiệt: 95°C trong 7 phút, 30 chu kỳ (95°C trong 60 giây, 54°C trong 60 giây, 72°C trong 60 giây), 72°C trong 7 phút, bảo quản ở 4°C. Điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1% với thang chuẩn 1kb Promega. Xem kết quả, chụp hình gel bằng máy Gel Documentation.

#### *Phân tích DNA cây bông vải chuyển gen GNA Southern blot*

Phương pháp tạo mẫu dò và phát hiện bằng CDP-*Star* của Amersham (RPN3680, RPN 3682) được dùng để phân tích các dòng cây bông vải chuyển gen. DNA của mỗi dòng cây chuyển nạp gen và đối chứng âm (cây không được chuyển nạp gen) ủ với enzyme giới hạn *KpnI* ở 37°C trong 4 giờ. Đối chứng dương là plasmid CAMBIA2301-RSs1.GNA được cắt với hai enzyme *KpnI* và *SacI* ở 37°C. Mẫu DNA được điện di trên gel agarose 1% ở 25vol qua đêm cùng với thang chuẩn  $\lambda$ HindIII. Chuyển DNA lên màng lai Hybond-N (GE healthcare), lai qua đêm với mẫu dò là trình tự DNA 500bp đã được tinh sạch của gen *GNA* tạo ra từ phản ứng PCR. Mẫu dò cho thang chuẩn  $\lambda$ HindIII cũng được thực hiện cùng với mẫu dò cho gen *GNA*. Trong giai đoạn lai, bỏ đồng thời hai mẫu dò này vào buồng lai. Hiện phim theo hướng dẫn của Amersham.

### 2.5. Kiểm tra biểu hiện gen *GNA* trong cây chuyển gen bằng Western blot

Dùng phương pháp tách chiết protein của Khan et al. (2011). Pha dung dịch tách chiết có

40mM EDTA, 10% glycerol, 150mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 10mM NH<sub>4</sub>Cl, 20mM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride), 10mM DTT (dithiotheritol). Nghiền 0,5g lá bông vải trong nitơ lỏng, thêm vào 1ml dung dịch tách chiết, ủ ở 4°C trong 20 phút. Ly tâm ở 14.000 vòng/phút trong 20 phút ở 4°C. Hút lấy phần dịch trong cho vào ống nghiệm mới. Chia dịch tách chiết protein thành mỗi 100µl trong các eppendorf và bảo quản ở -20°C. Tính lượng protein tổng tan bằng phương pháp Bradford với chất chuẩn là bovin serum albumin (BSA).

Protein được phân tách bằng điện di SDS-PAGE có Resolving gel 12% và Stacking gel 4%. Mỗi giếng cho vào khoảng 20µg protein tổng tan, đối chứng dương là 50ng protein GNA (L8275 Sigma) và dùng thang chuẩn protein RPN810. Sau đó chuyển protein sang màng Hybond-P (RPN2020F-GE Healthcare) bằng thiết bị semi-dry blotter (Apelex). Ngâm, lác nhẹ màng trong dung dịch cố định (0,1% Tween 20/PBS, 5% sữa không béo Marvel) 1h ở nhiệt độ phòng. Rửa màng bằng dung dịch 0,1% Tween 20/PBS trong 15 phút và ngâm, lác nhẹ màng trong dung dịch kháng thể thứ nhất (AS-2240-Vector Laboratory) được pha trong dung dịch cố định theo tỉ lệ 1 : 500 trong 3h ở nhiệt độ phòng. Rửa màng bằng dung dịch 0,1% Tween 20/PBS trong 15 phút và ngâm lác nhẹ màng với dung dịch kháng thể đơn dòng có gắn HRP (A9452-Sigma) và S-protein-HRP (RPN810) được pha trong dung dịch cố định theo tỉ lệ 1:1.000 trong 2h ở nhiệt độ phòng. Rửa màng bằng dung dịch 0,1% Tween 20/PBS trong 15 phút rồi tiếp tục rửa bằng PBS và nước cất trong 5 phút để loại bỏ Tween. Thêm 5ml dung dịch phát hiện (ECL<sup>TM</sup>-Prime Western Blotting Detection Reagent-RPN2232) lên trên màng, lác đều trong 5 phút. Hiện phim trên Amersham Hyperfilm<sup>TM</sup> ECL (GE Healthcare).

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Vector chuyển gen

Trong vector tái tổ hợp pCAMBIA2301-RSs1.GNA (Hình 2), gen GNA được điều khiển bởi promoter RSs1 (Rice Sucrose synthase-1).

Mẫu chuyển gen bằng vector này được chọn lọc bằng kanamycin và gen *gus* sẽ chỉ biểu hiện trong cây chuyển gen. Promoter RSs1 đã được chứng minh giúp biểu hiện gen GNA tại bó mạch cây chuyển gen (Shi et al., 1994; Rao et al., 1998) và dùng trong chuyển gen cây bắp kháng rầy rệp, loài chích hút nhựa luyện trong bó mạch (Wang et al., 2005).

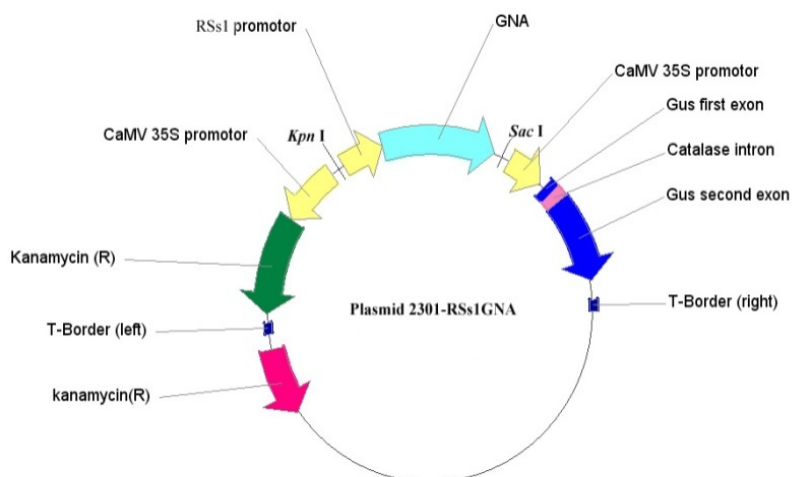
#### 3.2. Khử trùng hạt bông vải

Với thời gian khử trùng 30 phút và nước Javel có nồng độ Clor 2,5% (w/v) hoặc 40 phút với Javel có nồng độ Clor 2% (w/v), nhận được hạt bông vải *in vitro* vô trùng và tỉ lệ nảy mầm 100%. Với thời gian khử trùng lâu hơn, vẫn nhận được 100% hạt bông vải vô trùng nhưng tỉ lệ nảy mầm giảm. Kết quả này nhận được từ các nghiệm thức khảo sát thời gian và nồng độ Clor trong nước Javel khi khử trùng hạt bông vải trong bảng 1.

Hơn nữa, kết quả này hướng đến dùng nước Javel để khử trùng thay vì dùng HgCl<sub>2</sub> như các tác giả trước đây (Nguyễn Thị Nhã 2012; Guo et al., 2007; Jin et al., 2005; Khan et al., 2010; Sunilkumar et al., 2001; Wu et al., 2005; Zhao et al., 2006), dù thời gian xử lý hạt nhanh hơn (khoảng 15 - 20 phút). HgCl<sub>2</sub> là chất độc, có ảnh hưởng xấu đến môi trường. Nghiên cứu của Wu et al. (2008) dùng hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) để khử trùng hạt bông nhưng thời gian xử lý kéo dài từ 3 - 4 giờ. Như vậy, lựa chọn nước Javel để khử trùng hạt là phù hợp với yêu cầu của thí nghiệm.

#### 3.3. Kiểm tra kết quả chuyển gen GNA vào cây bông vải

Sau khi thực hiện chuyển gen và qua quá trình chọn lọc với kanamycin, cùng với chuyển đổi môi trường phù hợp, nhận được hai dòng bông vải được xác định qua kỹ thuật nhuộm GUS, PCR và Southern blot. Từ khi mô sẹo được hình thành trên môi trường chọn lọc cho đến khi hình thành phôi, chúng đã được kiểm tra biểu hiện GUS (Hình 3). Sự biểu hiện GUS này chỉ có trên thực vật vì có trình tự intron trong gen GUS theo thiết kế của vector chuyển gen.

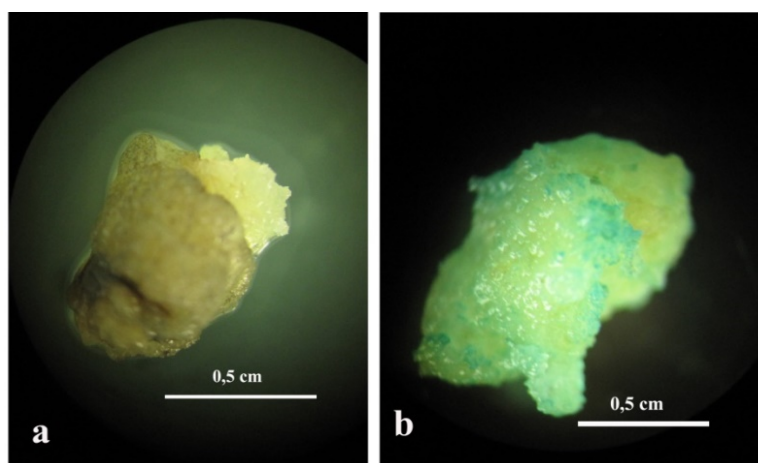


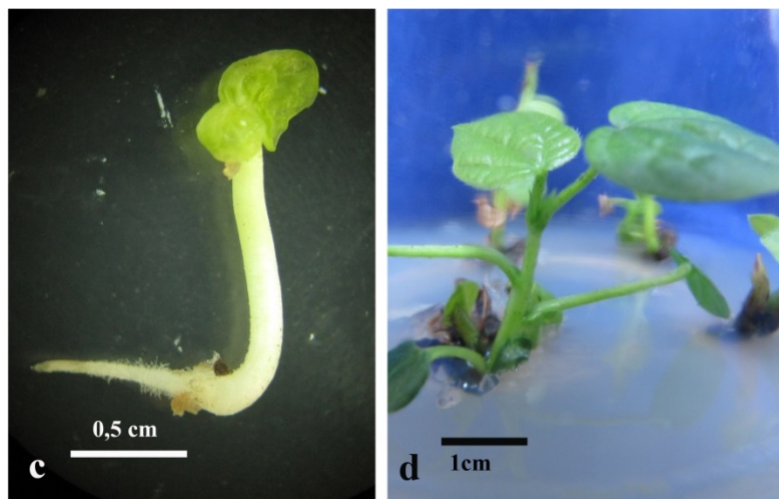
**Hình 2.** Sơ đồ cấu trúc vector pCAMBIA2301-RSs1.GNA

**Bảng 1.** Kết quả khảo sát nồng độ Clor và thời gian khử trùng hạt bông vải

Thời gian khử trùng + Nước Javel có nồng độ Clor	Phần trăm số hạt vô trùng (%)	Phần trăm số hạt vô trùng nảy mầm (%)
10 phút + 2%	46,67 <sup>d</sup>	100 <sup>a</sup>
20 phút + 2%	82,22 <sup>c</sup>	100 <sup>a</sup>
30 phút + 2%	91,11 <sup>b</sup>	100 <sup>a</sup>
40 phút + 2%	100,0 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
50 phút + 2%	100,0 <sup>a</sup>	84,45 <sup>b</sup>
10 phút + 2,5%	51,11 <sup>d</sup>	100 <sup>a</sup>
20 phút + 2,5%	88,89 <sup>bc</sup>	100 <sup>a</sup>
30 phút + 2,5%	100,0 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
40 phút + 2,5%	100,0 <sup>a</sup>	93,33 <sup>a</sup>
50 phút + 2,5%	100,0 <sup>a</sup>	82,22 <sup>b</sup>

Ghi chú:  $p < 0,01$ ; trong phạm vi cột ký tự a - d: trong mỗi nghiệm thức có ít nhất một ký tự giống nhau thì sự khác nhau không có ý nghĩa bởi sự phân hạng của Duncan's multiple range test

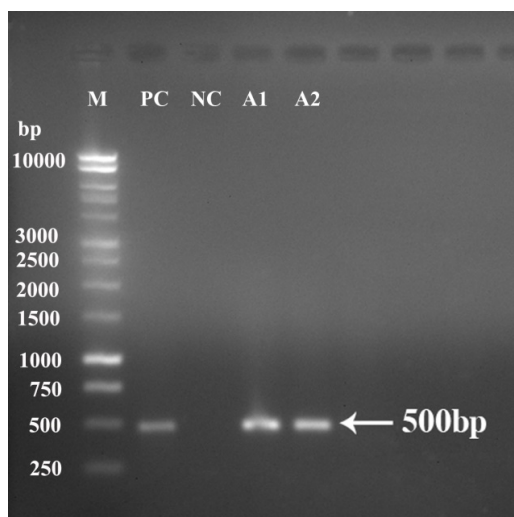




**Hình 3. Mô sẹo và cây bông vải chuyển gen**

Ghi chú: a. Mô sẹo hình thành trên môi trường chọn lọc; b. Mô sẹo biểu hiện GUS; c. Phôi chuyển gen nảy mầm; d. Cây bông vải chuyển gen sau 45 ngày

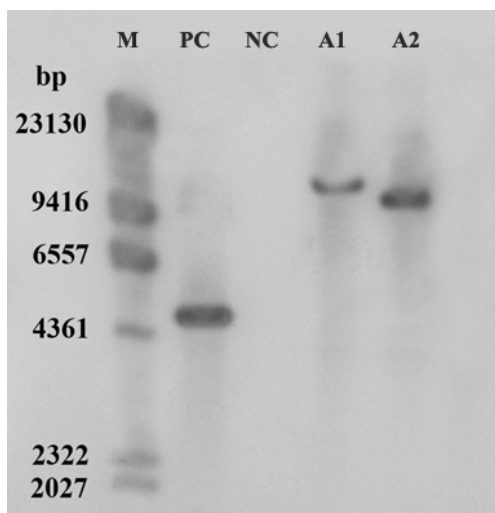
Phân tích các dòng bông vải kháng kanamycin bằng PCR và Southern để khẳng định gen *GNA* đã được chuyển vào trong cây. Kết quả PCR cho thấy có sự hiện diện của băng DNA 500bp ở đối chứng dương (plasmid) và các dòng bông vải chuyển gen (Hình 4). Kết quả này phù hợp với kết quả của McCafferty et al. (2008). Như vậy, gen *GNA* đã được cài vào trong bộ gen của cây bông vải kháng kanamycin.



**Hình 4. Kết quả phân tích gen *GNA* trong cây Bông chuyển gen bằng PCR**

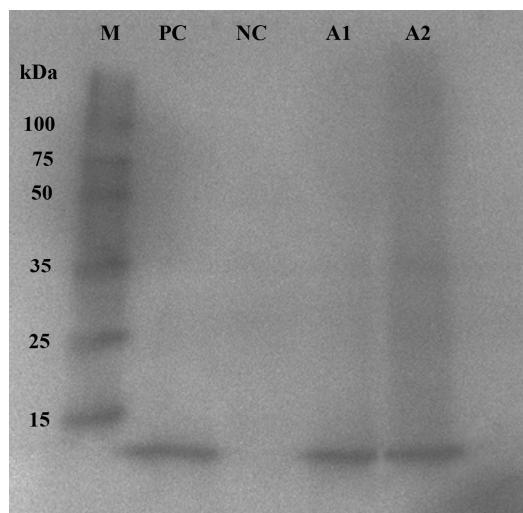
Ghi chú:  
 M. Thang chuẩn 1kb (Promega);  
 P. Plasmid CAMBIA2301-RSs1.GNA;  
 NC. Cây bông vải không chuyển gen;  
 A1, A2. Các dòng cây bông vải chuyển gen

Phân tích Southern blot cũng xác định được hai dòng cây bông vải chuyển gen *GNA*. Nhằm mục đích xác định từng dòng cây chuyển gen, sử dụng một enzyme *KpnI* để cắt DNA tổng số các dòng cây chuyển gen. Kết quả Southern blot cho thấy gen *GNA* vào trong bộ gen cây ở những vị trí khác nhau với những dòng cây khác nhau được thể hiện qua vị trí các băng DNA trên hình 5. Đối chứng dương là đoạn DNA 4,7kb được cắt từ plasmid CAMBIA2301-RSs1.GNA bởi hai enzyme *KpnI* và *SacI*. Như vậy, đây là hai dòng cây bông vải chuyển gen *GNA* khác nhau. Với việc chuyển gen bằng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*, những dòng cây chuyển gen chỉ có một bản sao (copy) của gen *GNA*. Trong hình kết quả Southern blot, thang chuẩn  $\lambda$ HindIII hiện lên rất rõ trên phim. Điều này minh chứng cho việc đánh dấu thang chuẩn và dùng chính nó làm mẫu dò khi sử dụng bộ kit Southern của Amersham.



**Hình 5. Kết quả phân tích DNA cây bông chuyển gen bằng Southern blot**

Ghi chú: M. Thang chuẩn  $\lambda$  HindIII; PC. Đoạn DNA 4,7kb được cắt từ plasmid CAMBIA2301-RSs1.GNA bởi hai enzyme KpnI và SacI; NC. Cây bông vải không chuyển gen; A1, A2. Hai dòng cây bông vải chuyển gen.



**Hình 6. Kết quả phân tích protein cây bông chuyển gen bằng Western blot**

Ghi chú: M. Thang chuẩn RPN810; PC: Protein GNA chuẩn (L8275 Sigma); NC. Cây bông vải không chuyển gen; A1, A2. Các dòng cây bông vải chuyển gen.

### 3.4. Kiểm tra kết quả biểu hiện gen GNA chuyển vào cây bông vải

Protein cây bông vải chuyển gen qua phân tích Western blot đã cho thấy có sự biểu hiện gen GNA. Kết quả ở hình 6 cho thấy có sự hiện diện của protein GNA trong cây chuyển gen khi được phát hiện bằng kháng thể đặc hiệu. Điều này cho biết gen GNA đã gắn ổn định vào trong bộ gen cây bông vải và hoạt động phiên mã dịch mã tốt. Bằng protein GNA chuẩn có kích thước là 13kDa. Protein GNA trong cây bông vải chuyển gen được xác định xấp xỉ 12kDa (Rao et al., 1998; Storge et al., 1999). Nhưng trong công bố của McCafferty et al. (2008), protein GNA trong cây chuyển gen có kích thước 13kDa khi chuyển gen GNA tổng hợp vào cây đu đủ.

## 4. KẾT LUẬN

Khử trùng hạt bông vải bằng nước tẩy có nồng độ Clor 2,5% trong 30 phút, sau khi đã loại lớp bông bên ngoài bằng axit  $H_2SO_4$ , để có cây bông vải *in vitro*. Nhận được hai dòng cây bông vải giống Coker 312 mang gen GNA bằng phương pháp chuyển gen dùng vi khuẩn *Agrobacterium*

*tumefaciens*. Hai dòng cây chuyển gen này mang một copy gen GNA được minh chứng bằng kỹ thuật PCR và Southern blot khi phân tích cây chuyển gen *in vitro* sinh trưởng tốt trên môi trường có bổ sung kanamycin 50 mg/l. Hơn nữa, những dòng cây chuyển gen này cho thấy sự hoạt động tốt của gen chuyển với sự biểu hiện của gen GNA trong cây khi được phân tích bằng kỹ thuật Western blot.

## LỜI CẢM ƠN

Chân thành cảm ơn Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Tế bào thực vật phía Nam đã tài trợ kinh phí và thiết bị để thực hiện đề tài này.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Bayley C., Trolinder N., Ray C., Morgan M., Quisenberry J.E., and Ow D.W. (1992). Engineering 2,4-D resistance into cotton. *Theoretical and Applied Genetic.*, 83: 645-649.
- Gatehouse, A.M.R., Powell, K.S., Van Damme, E.J.M., Peumans, W.J., Gatehouse, J.A. (1995). Insecticidal properties of plant lectins: their potential in plant protection. *In: Pustzai, A.,*

- Bardocz, S. (Eds.), Lectins: Biomedical Perspectives, Taylor and Francis, London, 35-58.
- Guo X., Huang C., Jin S., Liang S., Nie Y. and Zhang X. (2007). *Agrobacterium*-mediated transformation of *Cry1C*, *Cry2A* and *Cry9C* genes into *Gossypium hirsutum* and plant regeneration. *Biologia Plantarum*, 51(2): 242-248.
- Jin S., Zhang X., Liang S., Nie Y., Guo X. and Huang C. (2005). Factors affecting transformation efficiency of embryogenic callus of Upland cotton (*Gossypium hirsutum*) with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 81: 229-237.
- Khan G.A., Bakhsh A., Riazuddin S., Husnain T., (2011). Introduction of *cry1Ab* gene into cotton (*Gossypium hirsutum*) enhances resistance against Lepidopteran pest (*Helicoverpa armigera*). *Spanish Journal of Agricultural Research*, 9(1): 296-302.
- Khan T., Reddy V.S., Leelavathi S. (2010). High-frequency regeneration via somatic embryogenesis of an elite recalcitrant cotton genotype (*Gossypium hirsutum* L.) and efficient *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Tiss Organ Cult.*, 101: 323-330.
- Li H., Luo J., Hemphill J.K., Wang J-T., Gould J. (2001). A rapid and high yielding DNA miniprep for cotton (*Gossypium* spp.). *Plant Molecular Biology Reporter* 19: 1-5.
- McCafferty R.K.H., Moore H.P., Zhu J.Y. (2008). Papaya transformed with the *Galanthus nivalis* GNA gene produces a biologically active lectin with spider mite control activity. *Plant Science*, 175: 385-393.
- Murashige T. and Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-497.
- Nguyễn Thị Nhã (2012). Xác định một số thông số thích hợp cho chuyển gen chịu hạn *DREB2ACA* và *P5CSM* vào cây Bông (*Gossypium hirsutum* L.) thông qua *Agrobacterium tumefaciens*. Luận án thạc sỹ, Đại học Nông Lâm, Tp. Hồ Chí Minh.
- Rao K.V., Rathore K.S., Hodges T.K., Fu X., Stoger E., Sudhakar D., Williams S., Christou P., Bharathi M., Bown D.P., Powell K.S., Spence J., Gatehouse A.M., Gatehouse J.A. (1998). Expression of snowdrop lectin (GNA) in transgenic rice plants confers resistance to rice brown planthopper. *Plant Journal*, 15(4): 469-477.
- Sauvion N., Rahbé Y., Peumans W.J., van Damme E., Gatehouse J.A., Gatehouse A.M.R. (1996). Effects of GNA and other mannose binding lectins on development and fecundity of the potato-peach aphid *Myzus persicae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 79: 285-293.
- Shi Y., Wang M.B., Powell K.S., Van Damme E., Hilder V.A., Gatehouse A.M.R., Boulter D., Gatehouse J.A., (1994). Use of the rice sucrose synthase-1 promoter to direct phloem-specific expression of b-glucuronidase and snowdrop lectin genes in transgenic tobacco plants. *Journal of Experimental Botany*, 45: 623-631.
- Stoger E., Williams S., Christou P., Down R.E., Gatehouse J.A. (1999). Expression of the insecticidal lectin from snowdrop (*Galanthus nivalis agglutinin*; GNA) in transgenic wheat plants: effects on predation by the grain aphid *Sitobion avenae*. *Molecular Breeding*, 5: 63-75.
- Sunilkumar G. and Rathore K.S. (2001). Transgenic cotton: factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration. *Molecular Breeding*, 8: 37-52.
- Wang Z., Zhang K., Sun X., Tang K., Zhang J. (2005). Enhancement of resistance to aphids by introducing the snowdrop lectin gene *GNA* into maize plants. *Journal of Bioscience*, 30(5): 627-638.
- Wilkins T.A., Mishra R. and Trolinder N.L. (2004). *Agrobacterium*-mediated transformation and regeneration of cotton. *Food, Agriculture & Environment*, 2(1): 179-187.
- Wu J., Zhang X., Nie Y. and Luo X. (2005). High-efficiency transformation of *Gossypium hirsutum* embryogenic calli mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration of insect-resistant plants. *Plant Breeding*, 124(2): 142-146.
- Wu S.J., Wang H.H., Li F.F., Chen T.Z., Zhang J., Jiang Y.J., Ding Y., Guo W.Z. and Zhang T.Z. (2008). Enhanced *Agrobacterium*-mediated Transformation of Embryogenic Calli of Upland Cotton via Efficient Selection and Timely Subculture of Somatic Embryos. *Plant Mol Biol Rep.*, 26: 174-185.
- Zhao F.Y., Li Y.F. and Xu P. (2006). *Agrobacterium*-mediated transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. Zhongmian 35) using glyphosate as a selectable marker. *Biotechnol Lett.*, 28: 1199-1207.