

THỬ NGHIỆM CHUYỂN GEN TRÊN LAN HỒ ĐIỆP (*PHALAEOPSIS AMABILIS* L.) BẰNG PHƯƠNG PHÁP BẮN GEN VÀ *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

Trần Lê Lưu Ly, Nguyễn Hữu Hoàng, Bùi Lan Anh, Trần Nguyên Vũ, Bùi Văn Lệ

Trường Đại học Khoa học Tự Nhiên, ĐHQG – HCM

(Bài nhận ngày 08 tháng 10 năm 2007, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 05 tháng 05 năm 2008)

TÓM TẮT: Chúng tôi đã thử nghiệm chuyển gen thành công với hai phương pháp chuyển gen bằng *Agrobacterium tumefaciens* và bắn gen trên lan hồ điệp (*Phalaenopsis amabilis* L.) dựa trên nguồn vật liệu ban đầu là PLBs được nuôi trên môi trường lỏng tĩnh. Với thí nghiệm chuyển gen gián tiếp, chủng *A. tumefaciens* C58pGV2260 mang plasmid p35SGUS-INT chứa gen uidA và nptII được sử dụng và thu được kết quả biểu hiện GUS tối ưu ở nồng độ acetosyringone 50 μ M sau 4 ngày đồng nuôi cấy. Đối với phương pháp chuyển gen trực tiếp, chúng tôi sử dụng hệ thống máy bắn gen BiolisticTM PDS-1000/He để biến nạp plasmid pBAR-GUS (chứa gen uidA và bar). Kết quả cho thấy, tỉ lệ biểu hiện GUS cao nhất được ghi nhận ở khoảng cách bắn 6 cm, nồng độ tungsten/DNA plasmid là 500 μ g/0,5 μ g.

1. GIỚI THIỆU

Lan Hồ Điệp (*Phalaenopsis* sp.) là một trong những loại cây cảnh phổ biến, có giá trị kinh tế cao và được ưa chuộng vào bậc nhất nhì ở hầu hết các nước trên thế giới. Theo số liệu thống kê của USDA, chỉ riêng tại thị trường Mỹ năm 2004, hơn 35,7 triệu cây Lan Hồ Điệp được tiêu thụ (tương đương 102 triệu USD), xếp thứ 2 về doanh thu sau cây Trạng Nguyên (*Poinsettia*) [4]. Cho đến nay, nhiều loài Lan Hồ Điệp chất lượng cao, có màu sắc và cấu trúc hoa đa dạng, nhiều nhánh, nhiều phát hoa, có hương thơm... được nhân giống và lai tạo bằng phương pháp truyền thống. Tuy nhiên, phạm vi và tính linh hoạt của các phương pháp này còn hạn chế, kỹ thuật chuyển gen có thể đưa ra một con đường hiệu quả hơn các phương thức thông thường cho phép đưa các tính trạng đặc biệt vào Lan Hồ Điệp như khả năng tổng hợp sRNA kháng virus gây cháy lá, khả năng tự tổng hợp wasabi (mù tặc) để kháng bệnh, hay mang gen kháng acetylene giúp hoa lâu tàn [2]...

Với mục tiêu bước đầu thử nghiệm quy trình, chúng tôi tiến hành biến nạp plasmid p35SGUS-INT và pBAR-GUS vào Lan Hồ Điệp bằng phương pháp gián tiếp nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* và phương pháp trực tiếp bằng súng bắn gen nhằm tạo tiền đề cho các nghiên cứu chuyển gen mục tiêu về sau.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

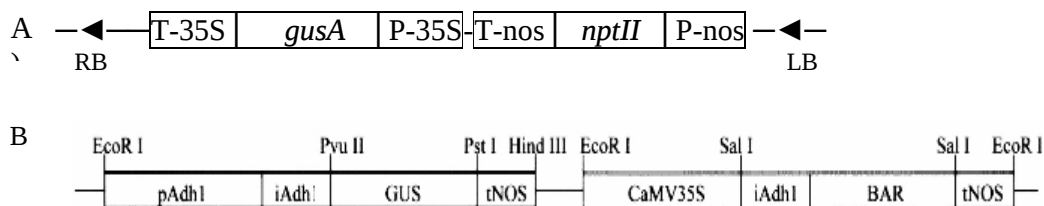
2.1. Vật liệu

2.1.1. Vật liệu cây và môi trường nuôi cấy

PLB (Protocorm Like Body) có nguồn gốc từ lá của giống Lan Hồ Điệp *Phalaenopsis amabilis* L. được nuôi trên môi trường HY bổ sung 30 g/l glucose, NAA 0,5 mg/l và BAP 2 mg/l bằng phương pháp lỏng tĩnh trong 2 tháng [3]. Lát mỏng (1 – 2 mm) của các PLB này được sử dụng làm mẫu cấy trong tất cả các thí nghiệm chuyển gen.

2.1.2. Chứng vi khuẩn và plasmid sử dụng trong chuyển gen bằng phương pháp gián tiếp

Chủng *A.tumefaciens* C58pGV2260 (Debleare và cộng sự, 1985) mang plasmid p35SGUS-INT (Vancanneyt và cộng sự) chứa gen *nptII* và gen *uidA* (*gusA*) (hình 1A) có chèn một vùng intron vào đầu N-terminal của trình tự mã hóa chỉ cho phép biểu hiện hoạt tính GUS trong tế bào thực vật và không biểu hiện trong tế bào vi khuẩn.



Hình 1: Cấu trúc vùng T-DNA của plasmid p35SGUS-INT (A) và sơ đồ plasmid pBAR-GUS (B). RB: lề phải, LB: lề trái, P-35S: promoter 35S, T-35S: terminator 35S, *nptII*: neomycin phosphotransferase, *gus*: β -glucuronidase, T-nos: nopaline synthase, *iAdhI*: intron, *tNOS*: terminator NOS, *BAR*: mã hóa cho enzyme phosphinothricin acetyltransferase

2.1.3. Súng bắn gen và plasmid sử dụng trong phương pháp chuyển gen trực tiếp

Sử dụng hệ thống máy bắn gen BiolisticTM PDS-1000/He (Bio-Rad) để biến nạp plasmid pBAR-GUS có gen *uidA* (*gusA*) và gen *bar* (gen kháng PPT trong thành phần thuốc diệt cỏ) (hình 1B).

2.2. Phương pháp

2.1. Chuyển gen bằng phương pháp gián tiếp sử dụng vi khuẩn *A.tumefaciens*

Vi khuẩn *A.tumefaciens* được nuôi cấy lỏng qua đêm ở 22°C trong môi trường LB lỏng bổ sung rifampicin (50 mg/l) và kanamycin (50 mg/l). Pha loãng sinh khối vi khuẩn bằng MS ($OD_{600} = 0,8$) và bổ sung acetosyringone (AS) sao cho nồng độ cuối cùng là 25 – 300 μ M. Sau 4 ngày đồng nuôi cấy với vi khuẩn ở 22°C ủ tối, các mẫu cây được đem đi thử GUS.

2.2. Chuyển gen bằng phương pháp trực tiếp sử dụng súng bắn gen

Vi đạn được chuẩn bị theo phương pháp của Sanford và cộng sự (1993) với nồng độ 500 μ g tungsten/0,5 μ g DNA plasmid. Mẫu PLB được xếp kín thành một vòng tròn trên đĩa Petri chứa môi trường HY rắn bổ sung 30 g/l glucose, NAA 0,5 mg/l và BAP 2 mg/l. Thực hiện quy trình bắn gen với áp suất khí helium 1100 psi và các khoảng cách đặt mô mục tiêu trong buồng bắn lần lượt là 6, 9, 12 cm. Sau khi bắn được 48 giờ, các mẫu được đem đi thử GUS.

2.3. Thử GUS

Các mẫu sau khi chuyển gen được thử GUS theo quy trình của Jefferson và cộng sự (1987). Hoạt tính GUS thể hiện qua sự phân giải cơ chất 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide (X-Gluc) của enzyme β -glucuronidase (sản phẩm của gen *gusA*) thành chất có màu xanh chàm đặc trưng trên các vùng mô nhận gen chuyển. Theo dõi mức độ và % mẫu biểu hiện *gus* cho phép khẳng định tạm thời hiệu suất biến nạp gen.

3. KẾT QUẢ VÀ BIỆN LUẬN

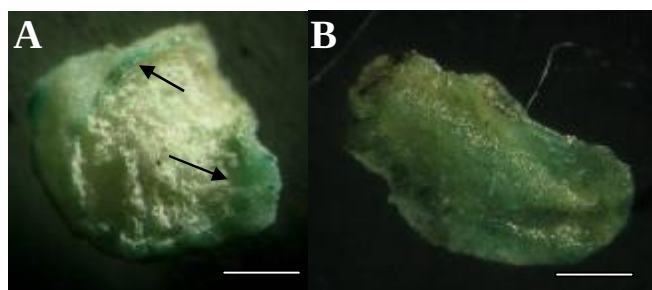
3.1. Chuyển gen bằng phương pháp gián tiếp sử dụng vi khuẩn *A. tumefaciens*

Kết quả thử GUS (bảng 1) cho thấy, có sự ảnh hưởng của AS lên hiệu quả biến nạp gen. Tỷ lệ % mẫu dương tính với GUS thấp nhất (60%) ở nồng độ 100 μM và 200 μM AS. Tỷ lệ này đạt tối ưu (100%) ở nồng độ AS 50 μM . Biểu hiện GUS trên mô mẫu phân bố thành mảng rộng, chủ yếu ở các lớp tế bào bề mặt, tại vết cắt và tại mặt tiếp xúc với môi trường (hình 2). Điều này có thể được giải thích là do vi khuẩn thường xâm nhập và khởi đầu sự chuyển T-DNA tại các vùng mô bị thương và các vùng mô đang diễn ra quá trình phân chia mạnh.

Lan Hồ Điệp (thuộc lớp một lá mầm) là một trong những loại cây khó đáp ứng với chuyển gen bằng vi khuẩn. Tuy nhiên, ở tất cả các nghiệm thức, chúng tôi ghi nhận tỷ lệ mẫu cho dương tính GUS đều từ 60% trở lên, cao hơn kết quả 42,4% của Belarmino và cộng sự (1998) nuôi cấy trên môi trường rắn. Kết quả này có phần đóng góp không nhỏ của nguồn vật liệu ban đầu là PLB nuôi trên môi trường lỏng tinh. Mẫu PLB này có tiềm năng là nguyên liệu thích hợp cho công tác chuyển gen vì ngoài tình trạng sinh lý tốt, chúng còn có vách tế bào (vốn là một trong các trở ngại khi chuyển gen) mỏng hơn mẫu nuôi bằng các phương pháp khác. Kết quả trên phù hợp với nghiên cứu của Ducrocq và cộng sự năm 1994 (sinh lý mẫu là một trong các yếu tố quyết định hàng đầu lên hiệu quả chuyển gen bằng phương pháp gián tiếp cũng như trực tiếp) và công trình của Han năm 2000 (PLB trên môi trường lỏng linh cho hiệu quả biến nạp và tỷ lệ tạo thể chuyển gen ổn định cao hơn PLB nuôi trên môi trường rắn hoặc lỏng) [1].

Bảng 1: Kết quả thử GUS ở các nồng độ AS khác nhau

Nồng độ AS (μM)	% mẫu dương tính với GUS
25	83,33
50	100
100	60
200	60
300	85,71



Hình 2: Mẫu dương tính với thuốc thử GUS. Mẫu ở nồng độ AS 50 μM (A); mẫu ở nồng độ AS 300 μM (B). Thanh ngang 2 mm.

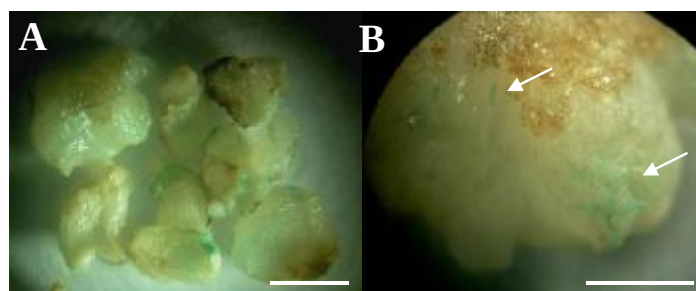
3.2. Chuyển gen bằng phương pháp trực tiếp sử dụng súng bắn gen

Khoảng cách đặt mô trong buồng bắn ảnh hưởng rất lớn lên hiệu quả bắn gen. Tỷ lệ mẫu PLB dương tính với thuốc thử GUS có sự khác biệt rõ giữa các khoảng cách bắn khác nhau, thấp nhất (7,69%) khi bắn ở khoảng cách 12 cm, tối ưu nhất (100%) ở khoảng cách 6 cm (bảng 2 – hình 3A). Sự biểu hiện GUS trên các mẫu dương tính không phân bố thành mảng rộng ở vùng bề mặt như mẫu chuyển gen bằng phương pháp *A. tumefaciens* mà phân bố thành cụm hoặc điểm rải rác trên mặt lát cắt hứng trực tiếp vi đạn (hình 3B). Kết quả trên rất khả quan so

với công trình gần đây về bắn gen Lan Hồ Điệp trên thế giới (Men và cộng sự, 2002: 66,67%), điều này càng chứng tỏ tính ưu việt của mẫu PLB nuôi trên môi trường lỏng tĩnh.

Bảng 2: Kết quả thử GUS ở các khoảng cách bắn khác nhau

Khoảng cách (cm)	% mẫu dương tính với GUS
6	100,00
9	25,00
12	7,69



Hình 3: Kết quả thử GUS. Mẫu ở khoảng cách bắn 6cm (A), sự phân bố GUS trên mẫu dương tính (B). Thanh ngang 2 mm.

3.KẾT LUẬN

Chúng tôi đã bước đầu thử nghiệm thành công hai quy trình biến nạp gen bằng phương pháp gián tiếp sử dụng chủng *Agrobacterium tumefaciens* C58pGV2260 và phương pháp sử dụng súng bắn gen. 100% mẫu biểu hiện GUS khi sử dụng phương pháp gián tiếp có nồng độ AS tối ưu là 50 μ M hay khi sử dụng hệ thống máy bắn gen với các thông số áp lực bắn 1100 psi, khoảng cách đặt mô trong buồng bắn 6 cm, nồng độ 500 μ g tungsten/0,5 μ g DNA plasmid với mẫu PLB Lan Hồ Điệp (*Phalaenopsis amabilis* L.). Thử nghiệm trên còn cho thấy ưu thế trong chuyển gen của PLBs lan nuôi cấy trên môi trường lỏng tĩnh. Tuy nhiên, nghiên cứu của chúng tôi chỉ là những thử nghiệm bước đầu, cần phải thực hiện thêm các nghiên cứu khác để hoàn thiện quy trình chuyển gen như khảo sát ảnh hưởng của nồng độ vi khuẩn, thời gian đồng nuôi cấy, các yếu tố nhiệt độ ánh sáng...lên hiệu quả biến nạp bằng phương pháp gián tiếp, hay các thông số áp lực bắn, số lần bắn, nồng độ tungsten/DNA...đối với phương pháp trực tiếp.

TESTING PROTOCOLS FOR TRANSFORMATION OF *PHALAENOPSIS AMABILIS* L. BY BIOLISTIC AND *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

Tran Le Luu Ly, Nguyen Huu Hoang, Bui Lan Anh, Tran Nguyen Vu, Bui Van Le
University of Natural Sciences, VNU - HCM

ABSTRACT: We have succeeded in testing protocols for producing transgenic plant using *Agrobacterium tumefaciens* and microprojectile bombardment for PLB laminae of *Phalaenopsis amabilis* L. cultured in stationary liquid medium. In mediated transformation, *A.tumefaciens* C58pGV2260 containing p35SGUS-INT with the *uidA* gene and *nptII* gene was used, and maximum level of *gus* expression was observed 4 days after co-cultivation with acetosyringone concentration was 50 μ M. In direct gene transformation, we used BiolisticTM PDS-1000/He system to transfer pBAR-GUS (containing *uidA* gene and *nptII* gene) into plant cells. The result showed that PBL had the highest GUS activity at 6 cm fire distance with 500 μ g tungsten and 0,5 μ g DNA mix.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Han. US Patent 6020538, (2000).
- [2]. Rinaldi Sjahril DPC, Raham Sher Khan, Saburo Yamamura, Ikuo Nakamura, Yoshimiki Amemiya, Masahiro Mii, *Transgenic Phalaenopsis plants with resistance to Erwinia carotovora produced by introducing wasabi defensin gene using Agrobacterium method*. Plant biotechnology. 23:191-194.3, (2006).
- [3]. So-Young Park HNM, Kee-Yoeup Paek, Rapid propagation of *Phalaenopsis* from floral stalk-derived leaves, *In vitro cell development biology*. 38:168-172. 4, (2002).
- [4]. United States Department of Agricultural, Floriculture Crops 2005 Summary. P. 32-33, (2006).