

NGHIÊN CỨU CHUYỂN GEN MÃ HÓA GIBBERELLIN 20-OXIDASE VÀO CÂY XOAN TA (*MELIA AZEDARACH* L.) BẰNG *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

Đỗ Xuân Đồng¹, Bùi Văn Thắng², Hồ Văn Giảng², Lê Văn Sơn¹, Chu Hoàng Hà¹

¹Viện Công nghệ sinh học

²Trường Đại học Lâm nghiệp

TÓM TẮT

Gibberellin (GA) 20-oxidase (GA20ox) là một enzyme xúc tác then chốt trong bước cuối cùng để tổng hợp GA. Trong bài báo này, chúng tôi đã nghiên cứu chuyển gen mã hóa cho GA20ox vào cây xoan ta nhằm tạo ra cây xoan chuyển gen có hàm lượng GA20ox tăng. Thân mầm của cây xoan 15 ngày nuôi (tính từ khi hạt xoan được đặt trên môi trường này mầm) cắt thành các đoạn nhỏ có chiều dài 1,5 cm được nhiễm đồng thời với dịch huyền phù vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* chủng CV58 mang vector pBI121-GA20ox trong thời gian 30 phút, lắc không liên tục. Sau đó, mẫu được thấm khô và đặt mẫu trên môi trường đồng nuôi cây (MS + 1 mg/l BAP + 1 mg/l NAA và dịch huyền phù thuốc lá) ở nhiệt độ $25 \pm 2^\circ\text{C}$ trong tối, thời gian 48 h. Đoạn thân chuyển gen được tái sinh trên môi trường MS có chứa 2 mg/l BAP và chất kháng sinh chọn lọc kanamycin nồng độ 150 mg/l. Mẫu được nuôi cấy liên tục trên môi trường tái sinh sau 8 tuần, cứ 3 tuần lại cấy chuyển sang môi trường mới một lần. Những cây xoan chuyển gen được xác định bằng phản ứng PCR và RT-PCR với cặp mồi đặc hiệu. Các dòng cây chuyển gen cho thấy sự tăng trưởng mạnh mẽ về chiều cao so với sự phát triển bình thường của dòng cây không chuyển gen.

Từ khóa: Cây xoan ta (*Melia azedarach* L.), Gibberellin 20-oxidase (GA20ox), PCR, RT-PCR

MỞ ĐẦU

Gibberellins (GAs) là một họ của hormone thực vật, nó kiểm soát nhiều đường hướng sự sinh trưởng và phát triển của thực vật bao gồm sự kéo dài thân, sự nảy mầm, sự chuyển tiếp từ sinh trưởng đỉnh đường sang giai đoạn ra hoa, tạo hạt và quả (Hedden, 1999; Olszewski *et al.*, 2002; Swain, Singh, 2005; Yamaguchi 2006, 2008). Trong số 126 GAs được phát hiện ở thực vật bậc cao và nấm, chỉ một số ít có hoạt tính sinh học độc lập. Những GAs có hoạt tính sinh học quan trọng nhất đối với sinh trưởng và phát triển sinh đường là GA₁ và GA₄. Hầu hết các loài cây đã nghiên cứu thì GA₁ có hoạt tính sinh học chiếm ưu thế, trong khi chỉ có các loài cây khác thì chứa GA₄ nhiều hơn GA₁ (Hedden, 1999; Yamaguchi, 2006). GAs đều xuất phát từ vòng entkaurene, sự hình thành các GAs là do một chuỗi các phản ứng oxy hóa được hoạt hóa bởi các mono-oxygenase liên kết màng và các dioxygenase hòa tan. Các P450 mono-oxygenase tổng hợp GA₁₂ và GA₅₃ trong các phản ứng ban đầu, tiếp đó các GAs này được chuyển đổi thành C₁₉-GA nhờ hai loại dioxygenase chính là GA20ox và 3β-hydroxylase. GA20ox hình thành vòng C₁₉ bằng cách oxy hóa vòng C₂₀ của GA₁₂ và GA₅₃, còn 3β-hydroxylase nó hoạt hóa sự 3β-hydroxylase của vòng C₁₉ và tạo

thành các GAs có hoạt tính sinh học (Hedden, Phillips, 2000; Olszewski *et al.*, 2002). Như vậy, GA20ox có vai trò rất quan trọng trong con đường sinh tổng hợp GAs. Gene GAs có tính bảo thủ cao giữa các loài (*Arabidopsis*, đậu, lúa, bắp cải, khoai lang...).

Trong một thí nghiệm trên cây dương (*Populus tremula* × *Populus tremuloides*), gene GA20ox được biểu hiện dưới điều khiển của promoter 35S đã làm tăng hoạt tính của GA 20 lần và dẫn tới tăng sinh trưởng và phát triển chiều cao của cây (Eriksson *et al.*, 2000). Sự phát triển nhanh do sự biểu hiện GA20ox cũng đã được phát hiện ở *Arabidopsis* (Huang *et al.*, 1998; Coles *et al.*, 1999), khoai tây (*Solanum tuberosum*; Carrera *et al.*, 2000), và thuốc lá (*Nicotiana tabacum*; Vidal *et al.*, 2001)...

Cây xoan ta (*Melia azedarach* Linn) là cây mọc tự nhiên, ưa sáng có phổ thích ứng rộng, gỗ có màu hồng hay nâu nhạt, thường dùng trong xây dựng, trang trí nội thất và điêu khắc (Coto, De Torres, 1999; Andrei *et al.*, 2000; Ursi Ventura, Ito, 2000). Ở nước ta, xoan ta là một trong những cây trồng quan trọng trong chiến lược phát triển lâm nghiệp. Theo quyết định số 16/2005/QĐ-BNN ngày 15/03/2005 của Bộ trưởng Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn, xoan ta đứng đầu trong danh mục các cây trồng được ưu

tiến phát triển. Trong nghiên cứu trước đây, chúng tôi đã phân lập được cDNA của gen GA20-oxidase (GA20ox) từ *Arabidopsis* và đã thiết kế thành công vào vector chuyển gen pBI121. Trong bài viết này, chúng tôi sử dụng vector này để chuyển gen GA20ox dưới sự điều khiển 35S promoter vào cây xoan ta. Kết quả đã thu được một số dòng cây xoan ta mang gen chuyển và có khả năng sinh trưởng nhanh hơn 2,5 lần cây đối chứng không chuyển gen sau 2 tháng phát triển trong nhà lưới.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên liệu

Quả xoan ta được thu hái và chọn lọc từ những cây trội (cây được chọn lọc trong quần thể dựa trên tính trạng sinh trưởng tốt) được Trung tâm Giống và Công nghệ sinh học, Viện Sinh thái rừng và Môi trường, Trường Đại học Lâm nghiệp cung cấp. Chúng vi khuẩn *A. tumefaciens* CV58 chứa vector pBI121_GA20ox mang gen mã hóa GA 20-oxidase của *Arabidopsis* nhận được từ Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học.

Các loại môi trường nuôi cấy sử dụng trong thí nghiệm được tham khảo từ các công trình nghiên cứu đã công bố (Murashige, Skoog, 1962; Đỗ Xuân Đồng *et al.*, 2008).

Khử trùng hạt và chuẩn bị nguyên liệu cho chuyển gen

Hạt được sát khuẩn bề mặt bằng ethanol 70% trong 3 phút, tiếp tục khử trùng bằng Javen 100% trong 10 phút và chuyển sang Javen 50% trong 5 phút (lần nhẹ), tiếp theo loại bỏ Javen và rửa sạch bằng nước cất vô trùng 10 lần. Hạt sau khi đã khử trùng được nuôi cấy trên môi trường dinh dưỡng MS bổ sung thêm 3% saccharose với mật độ 15 hạt/bình tam giác 250 ml.

Tạo dịch huyền phù *A. tumefaciens*

Một khuẩn lạc vi khuẩn được cấy chuyển vào 100 ml môi trường LB lỏng có bổ sung 50 mg/l Kanamycine, nuôi lắc 220 vòng/phút qua đêm ở nhiệt độ 28°C. Sau đó, chuyển 4 ml dịch huyền phù vào 50 ml môi trường LB lỏng mới, nuôi lắc tiếp 4 h trong điều kiện như trên. Ly tâm thu sinh khối tế bào rồi hòa tan trong môi trường 1/4 MS với OD₆₀₀ cuối cùng là 0,3.

Chuyển gen và tái sinh cây

Thân mầm của cây xoan ta thu được sẽ được cắt

thành những đoạn nhỏ có kích thước 0,5 cm, những đoạn thân này được nhiễm với dịch huyền phù vi khuẩn *A. tumefaciens*. Sau 30 phút, mẫu lá được chuyển lên môi trường đồng nuôi cấy trong thời gian 48 h và chuyển sang môi trường tái sinh. Cây xoan ta sau khi biến nạp được tái sinh và chuyển ra trồng trong nhà lưới theo qui trình của Đỗ Xuân Đồng và đồng tác giả (2008).

Phân tích sự có mặt của gen chuyển ở mức độ DNA

DNA tổng số được tách từ lá xoan theo phương pháp của Gawel và đồng tác giả (1991). Sự có mặt của gen GA20ox trong cây chuyển gen được kiểm tra bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu GA20ox-for (5' GGGCCTCTAGAAAAATGGCCGTAAGTTTCG 3') và GA20ox-rev (5' GGGGAGCTCTCTTAGATGGGTTTGGTGAG 3').

Phân tích biểu hiện của gen GA 20-oxidase ở mức độ phiên mã

RNA tổng số được tách từ các mẫu lá của cây chuyển gen bằng TRIzol (Invitrogen, Mỹ). Biểu hiện của gen GA20ox ở mức độ phiên mã được kiểm tra bằng kỹ thuật RT-PCR, sử dụng bộ kit SuperScript™ One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq High Fidelity (Invitrogen, Mỹ) với cặp mồi PCR đặc hiệu GA20ox1 (TCAGCCATTGGGAAGGTGT)/GA20ox2 (TGGGGTTGGGACGAATGG).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Chuyển gen và tái sinh cây

Gen GA20ox được điều khiển biểu hiện bởi promoter 35S (Hình 1A) và được chuyển thông qua *Agrobacterium*. Trong 3 đợt thí nghiệm với tổng số 613 mẫu thân mầm đồng nuôi cấy với *A. tumefaciens*, chúng tôi thu được 18 chồi tạo rễ và tái sinh trên môi trường có chứa 100 mg/l kháng sinh chọn lọc. Hiệu quả biến nạp gen trung bình đạt được là 2,92% (Bảng 1). Kết quả này chứng tỏ rằng chúng vi khuẩn CV58 được sử dụng là chủng có hiệu quả trong biến nạp gen vào xoan ta, điều này phù hợp với kết quả của các công trình khác khi nghiên cứu về chuyển gen trên đối tượng cây hai lá mầm (Liu *et al.*, 1995; Trujillo *et al.*, 2001; Ducreux *et al.*, 2005). Các dòng cây kháng kanamycin này được trồng lên giá thể bầu đất và được chăm sóc trong điều kiện nhà lưới để phân tích mức độ phân tử cũng như đánh giá về sự sai khác kiểu hình giữa dòng cây chuyển gen và không chuyển gen.

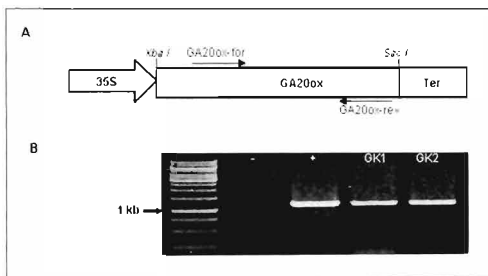
Phân tích sự có mặt của gen GA20ox ở mức độ DNA

Bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu, những dòng xoan ta chuyển gen được kiểm tra sự có mặt của gen chuyển GA20ox. Theo tính toán lý thuyết, sản phẩm PCR là một phần của gen GA20ox với kích thước khoảng 1,1 kb. Kết quả nghiên cứu cho thấy 2 dòng cây chuyển gen được trồng và phát triển trong nhà lưới có mang đoạn

gen với kích thước tương tự mẫu đối chứng dương (vector pBI121-GA20ox) và kích thước phù hợp với tính toán theo lý thuyết. Ngược lại, không thu được đoạn gen này trong mẫu cây xoan không chuyển gen (hình 1B). Điều này cho thấy các dòng cây chuyển gen thu được đều có mang gen chuyển GA20ox. Các dòng cây này được phân tích khả năng biểu hiện gen chuyển và kiểu hình của cây.

Bảng 1. Hiệu suất của những thân mầm chuyển gen.

Thí nghiệm	Số mẫu	Hiệu quả chuyển gen (%)	Hiệu quả chuyển gen TB (%)
1	181	2,76	
2	232	3,02	2,92
3	200	3,00	



Hình 1. Cấu trúc gen dùng cho biến nạp (A) và điện di sản phẩm PCR phân tích cây chuyển gen (B). GK1 và GK2 - các dòng cây chuyển gen; -, cây không chuyển gen; +, đối chứng dương là plasmid pBI121-GA20ox.

Phân tích biểu hiện của gen GA20ox

Kỹ thuật RT-PCR được sử dụng để phân tích biểu hiện của gen ở mức độ phiên mã. Từ RNA tổng số của các dòng cây chuyển gen, cDNA đã được tổng hợp bằng phản ứng phiên mã ngược. Dùng cặp mồi đặc hiệu cho GA20ox1/GA20ox2 nhân đoạn gen GA20ox có kích thước khoảng 0,3kb. Tương tự như trong phân tích bằng kỹ thuật PCR, vector chuyển gen pBI121-GA20ox và các dòng cây không chuyển gen cũng được sử dụng làm đối chứng. Kết quả ở hình 2A cho thấy ở đối chứng dương và các dòng

cây chuyển gen (GK1 và GK2) sản phẩm RT-PCR thu được có chứa đoạn gen kích thước phù hợp với lý thuyết. Sản phẩm này không thấy xuất hiện ở cây không chuyển gen (WT). Kết quả này chứng tỏ GA20ox trong các cây chuyển gen đã biểu hiện khá mạnh ở mức độ phiên mã.

Bên cạnh việc đánh giá mức độ biểu hiện của gen trong các dòng cây chuyển gen ở mức độ phiên mã thì chúng tôi cũng bước đầu đánh giá sơ bộ về sự sai khác kiểu hình giữa dòng cây chuyển gen so với dòng cây không chuyển gen trong điều kiện phát

trên ở nhà lưới. Sau thời gian 2 tháng trồng trên giá thể bầu đất, các dòng cây chuyển gen GA20ox có các lóng thân phát triển dài ra và chiều cao cây phát triển gấp 2,5 lần so với chiều cao cây đối chứng không chuyển gen (WT) (hình 2B). Hình dạng lá, đường kính thân chưa thấy sự sai khác giữa dòng cây chuyển gen so với dòng cây không chuyển gen. Hiện

tượng cây chuyển gen phát triển nhanh hơn cây đối chứng là do gen GA20ox hoạt động trong cây tham gia vào các quá trình tổng hợp cơ bản để tạo các GAs kích thích cho cây sinh trưởng và phát triển nhanh (Oikawa *et al.*, 2004). Kết quả này cũng được Eriksson và cộng sự thu được trên cây dương chuyển gen GA20ox (Eriksson *et al.*, 2000).



Hình 2. Phân tích sự biểu hiện gen GA20ox trong dòng cây chuyển gen bằng phản ứng RT-PCR (A) và kiểu hình (B). GK1 và GK2: các dòng cây chuyển gen; - và WT: đối chứng cây không chuyển gen; +: đối chứng dương là plasmid pBI121-GA20ox.

KẾT LUẬN

Gen mã hóa GA20ox đã được chuyển vào cây xoan ta với hiệu suất đạt 2,92%. Các dòng cây chuyển

gen đã được khẳng định mang gen chuyển bằng PCR. Phân tích sự biểu hiện của gen chuyển bằng RT-PCR cho thấy gen GA20ox biểu hiện khá mạnh, dẫn tới cây chuyển gen có sinh trưởng và phát triển nhanh hơn

hần so với dòng cây không chuyển gen.

Lời cảm ơn: Công trình hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài thuộc Chương trình trọng điểm phát triển và ứng dụng Công nghệ sinh học trong nông nghiệp, Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn. Nghiên cứu được thực hiện có sự dụng các trang thiết bị của Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Andreu J, Sans A, Riba M (2000) Antifeedant activity of fruit and seed extract of *Melia azedarach* and *Azadirachta indica* on larvae of *Sesamia nonagrioides*. *Phytoparasitica* 28: 311-319.

Breuer M, Schmidt GH (1995) Influence of a short period treatment with *Melia azedarach* extract on food intake and growth of the larvae of *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lep., Noctuidae). *J Plant Dis Protect* 102: 633-654.

Carrera E, Bou J, Garcia-Martinez JL, Prat S (2000) Changes in GA 20-oxidase gene expression strongly affect stem length, tuber induction and tuber yield of potato plants. *Plant J* 22: 247-256.

Coles JP, Phillips AL, Croker SJ, Garcia-Lepe R, Lewis MJ, Hedden P (1999) Modification of gibberellin production and plant development in *Arabidopsis* by sense and antisense expression of gibberellin 20-oxidase genes. *Plant J* 17: 547-556.

Coto CE, De Torres RA (1999) El paraiso (*Melia azedarach* L.): Fuente de productos bioactivos. *Dominguezia* 15: 5-15.

Cozzo D (1944) *Árboles para parques y jardines*. Suelo Argentino, Bs. As.:83-84.

Đỗ Xuân Đông, Bùi Văn Thắng, Hồ Văn Giảng, Nông Văn Hải, Chu Hoàng Hà (2008) Nghiên cứu hệ thống tái sinh cây xoan ta (*Melia azedarach* L.) thông qua phôi soma từ thân mầm phục vụ chuyển gen. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 6(2): 227-232.

Ducreux LJM, Morris WL, Taylor MA, Millam S (2005) *Agrobacterium*-mediated transformation of *Solanum phurej*. *Plant Cell Rep* 24: 10-14.

Eriksson ME, Israelsson M, Olsson O, Moritz T (2000) Increased gibberellin biosynthesis in transgenic trees promotes growth, biomass production and xylem fiber length. *Nat Biotechnol* 18: 784-788.

Hedden P (1999) Recent advances in gibberellin biosynthesis. *J Exp Bot* 50: 553-563.

Hedden P, Phillips AL (2000) Gibberellin metabolism: a new insights revealed by the genes. *Trends Plant Sci* 5: 523-530.

Huang SS, Raman AS, Ream JE, Fujiwara H, Cerny RE, Brown SM (1998) Overexpression of 20-oxidase confers a gibberellin-overproduction phenotype in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 118: 773-781.

Liu TH, Stephens CL, Hannapel DJ (1995) Transformation of *Solanum brevidens* using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep* 15(3-4): 196-199.

Oikawa T, Koshioka M, Kojima K, Yoshida H, Kawata M (2004) A role of OsGA20ox1, encoding an isoform of gibberellin 20-oxidase, for regulation of plant stature in rice. *Plant Mol Biol* 55: 687-700.

Oliszewski N, Sun TP, Gubler F (2002) Gibberellin signaling, biosynthesis, catabolism, and response pathways. *Plant Cell (Supplement)*: S61-S80.

Swain SM, Singh DP (2005) Tall tales from sly dwarves: novel functions of gibberellins in plant development. *Trends Plant Sci* 10: 123-129.

Trujillo C, Rodriguez-Arango E, Jaramillo S, Hoyos R, Orduz S, Arango R (2001) One step transformation of two Andean potato cultivars (*Solanum tuberosum* L. subsp. andigena). *Plant Cell Rep* 20: 637-641.

Ursi Ventura M, Ito M (2000) Antifeedant activity of *Melia azedarach* (L.) extracts to *Diabrotica speciosa* (Genn.) (Coleoptera: Chrysomelidae) beetles. *Braz Arch Biol Technol* 2: 215-219.

Vidal AM, Gisbert C, Talon M, Primo-Millo E, Lopez-Diaz I, Garcia-Martinez JL (2001) The ectopic overexpression of a citrus gibberellin 20-oxidase enhances the non-13-hydroxylation pathway of gibberellin biosynthesis and induces an extremely elongated phenotype in tobacco. *Physiol Plant* 112: 251-260.

Yamaguchi S (2006) Gibberellin biosynthesis *Arabidopsis*. *Phytochem Rev* 5: 39-47.

Yamaguchi S (2008) Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu Rev Plant Biol* 59: 225-251.

TRANSFORMATION OF GIBBERELLIN 20-OXIDASE ENCODED GENE TO PARADISE TREE (*MELIA AZEDARACH* L.) VIA *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

Do Xuan Dong¹, Bui Van Thang¹, Ho Van Giang², Le Van Son¹, Chu Hoang Ha^{1,*}

¹*Institute of Biotechnology*

²*Vietnam Forestry University*

SUMMARY

Gibberellin (GA) 20-oxidase (GA20ox) is a key enzyme that normally catalyzes the penultimate steps in GA biosynthesis. In this study, we investigated the transformation of gene coding for GA20ox into paradise tree Xoan, resulting in transgenic plants with higher content of GA20ox. To this aim, fifteen-day old paradise hypocotyls (starting when seeds were taken on germinative medium) were cut into segments with 1,5 cm in length and they were co-inoculated with the suspension of *Agrobacterium tumefaciens* CV58 strain containing the transformation vector pBI121_GA20ox for 30 minutes, shaking interruptedly. Then these samples were blotted and placed onto the co-culture medium (MS + 1 mg/l BAP + 1 mg/l NAA and the tobacco epidemic suspension) at the temperature of $25 \pm 2^\circ\text{C}$ for a 48-hour period in dark. After that, they were regenerated on MS medium containing 2 mg/l BAP and 150 mg/l kanamycin. Samples were continuously cultured for 8 weeks with a conversion to the new regeneration medium in every 3-week. The transgenic lines were analyzed by PCR and RT-PCR method with specific primers. There was an increase in height of transgenic plants compared to normal growth of wild-type plants.

Keywords: *Gibberellin 20-oxidase (GA20ox), paradise tree, PCR, RT-PCR*

* Author for correspondence: Tel: 84-4-37562368; Fax: 84-4-38363144; E-mail: chuhoangha@ibt.ac.vn