

Nghiên cứu chuyển gen mã hóa mannitol 1-phosphate dehydrogenase (*mtlD*) vào cây ngô

Lưu Hàn Ly¹, Lê Thị Thu Hiền^{1,2}, Nguyễn Xuân Thắng³, Huỳnh Thị Thu Huệ^{1,2*}

¹Viện Nghiên cứu hệ gen, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

²Học viện KH&CN, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

³Viện Nghiên cứu ngô, Viện Khoa học nông nghiệp Việt Nam

Ngày nhận bài 20/6/2018; ngày chuyển phản biện 29/6/2018; ngày nhận phản biện 7/8/2018; ngày chấp nhận đăng 16/8/2018

Tóm tắt:

Gen *mtlD* mã hóa mannitol 1-phosphate dehydrogenase ở vi khuẩn đã được nghiên cứu và chuyển vào một vài loại cây trồng. Các cây chuyển gen sinh trưởng nhanh và chịu mặn, hạn tốt hơn nhờ có sự tăng tích lũy mannitol. Với mục tiêu tạo cây ngô mang gen *mtlD*, các tác giả thực hiện nghiên cứu chuyển gen *mtlD* vào phôi ngô nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. Tỷ lệ phát sinh mô sẹo ở hai đợt chuyển gen lần lượt đạt 17,70 và 13,24%. Trong đó, trung bình khoảng 56% số chồi tái sinh tạo rễ thành cây hoàn chỉnh. Các cây ngô tái sinh sau đó được chăm sóc trong điều kiện đồng ruộng và 44 cây ngô sống sót đến giai đoạn sinh sản. Nghiên cứu đã sử dụng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu để sàng lọc cây chuyển gen và xác định được 8 cây ngô dương tính với sự có mặt của gen *mtlD*, đạt tỷ lệ 18,18% so với tổng số cây sống sót.

Từ khóa: *Agrobacterium*, chuyển gen, *mtlD*, ngô.

Chỉ số phân loại: 4.6

Đặt vấn đề

Ngày nay, cây ngô được trồng trên khắp thế giới và trở thành một trong ba loại ngũ cốc quan trọng nhất đối với con người. Theo ước tính của Tổ chức lương thực và nông nghiệp Liên hợp quốc (FAO) năm 2012, lúa mì, ngô và lúa gạo chiếm đến 94% tổng lượng ngũ cốc được tiêu thụ toàn cầu [1]. Trong đó, ngô là loại ngũ cốc có sản lượng cao nhất hàng năm, khoảng 1.034,8 triệu tấn vào năm 2017/18 (so với lúa gạo là 488,3 triệu tấn và 758,2 triệu tấn ở lúa mì) [2]. Hiện nay, hạn hán là tác nhân khí hậu gây ảnh hưởng nghiêm trọng nhất đến các cây trồng nông nghiệp, đặc biệt là cây ngô. Cùng so sánh trong điều kiện thiếu nước như nhau, sản lượng cây ngô đã giảm khoảng 39% trong khi lúa mì chỉ giảm 20% sản lượng [3].

Kỹ thuật chuyển gen vào ngô mới bắt đầu từ những năm 1990 nhưng đã nhanh chóng được áp dụng để tạo ra những cây ngô biến đổi gen có chất lượng và năng suất cao. Cây ngô biến đổi gen kháng sâu chứa gen *Bt* được thương mại hóa vào năm 1996 [4]. Kể từ đó, các giống ngô kháng sâu và kháng thuốc diệt cỏ được chấp nhận và trồng ở nhiều nơi trên thế giới, đây được coi là thế hệ cây ngô chuyển gen đầu tiên. Đến nay, ngô là loại cây trồng có số lượng sự kiện chuyển gen được Bộ Nông nghiệp Hoa Kỳ (USDA) thông qua nhiều nhất, với 148 sự kiện. Ngô biến đổi gen hiện được trồng tại 16 quốc gia, chiếm 33% tổng diện tích trồng cây chuyển gen trên toàn cầu [5].

Ở nước ta, việc chuyển gen vào ngô đã được nghiên cứu trên một số gen như *CryIAC* mã hóa protein kháng sâu [6, 7], gen *Sh2* mã hóa enzyme ADP-glucose pyrophosphorylase [8], gen liên quan đến tính chịu hạn như *ZmNF-YB* được chuyển vào hai dòng ngô VH1 và C8H9 [9] hay *modiCspB* [10]. Các kết quả đều cho thấy tiềm năng có thể ứng dụng kỹ thuật chuyển gen vào cây ngô ở nước ta.

Trong số các gen được sử dụng cho chuyển gen cây trồng nhằm tăng tính chống chịu, một số gen có nguồn gốc từ vi sinh vật cũng đã được nghiên cứu để chuyển vào cây trồng như *TPSP* [11], *CspA/CspB* [12], *gdhA* có nguồn gốc từ *E. coli* [13] đã cải thiện đáng kể tính chống chịu với các bất lợi phi sinh học, như lạnh, nóng và thiếu nước. Cây trồng chuyển gen có khả năng phát triển mạnh trong điều kiện khô hạn, cho năng suất cao hơn so với giống cây trồng không được chuyển gen.

Ở thực vật, mannitol là chất có thể hòa tan, ngăn muối xâm nhập và có thể giải phóng gốc hydroxyl trong nhiều bất lợi phi sinh học khác nhau, vì vậy mang lại khả năng chống chịu hạn cho cây [14]. Do đó, gen *mtlD* của vi khuẩn mã hóa mannitol 1-phosphate dehydrogenase (EC1.1.1.17) chuyển hóa fructose 2 với 6-phosphate tạo thành mannitol-1-phosphate đã được sử dụng trong chuyển gen vào một số cây trồng. Kết quả tích cực của sự tăng tích lũy mannitol trong các cây chuyển gen đã được chứng minh trong nhiều nghiên cứu. Nhóm nghiên cứu của Karakas và cs (1997) đã

*Tác giả liên hệ: Email: hthue@igr.ac.vn

Transformation of maize (*Zea mays* L.) using mannitol 1-phosphate dehydrogenase (*mtlD*) genes

Han Ly Luu¹, Thi Thu Hien Le^{1,2},
Xuan Thang Nguyen³, Thi Thu Hue Huynh^{1,2*}

¹Institute of Genome Research, VAST

²Graduate University of Science and Technology, VAST

³Maize Research Institute

Received 20 June 2018; accepted 16 August 2018

Abstract:

The bacterial *mtlD* gene which encodes mannitol 1-phosphate dehydrogenase has been characterized and transferred into several crops. Transgenic plants exhibited the good development and drought or salinity tolerances as increased mannitol accumulation. With the aim of producing transgenic maize, the authors conducted this study which transferred *mtlD* into maize embryos via *Agrobacterium tumefaciens*. The rate of callus regeneration in two independent transformation experiments were 17.70 and 13.24%, respectively. Meanwhile, the average frequency of root formation was about 56%. The regenerated plantlets were transferred to the field and 44 T₀ maize plants survived and reached the reproducing stage. The authors used a PCR assay with the specific primers to determine the presence of the target gene in T₀ plants and obtained 8 *mtlD*-positive plants, accounting for 18.18% of total survival plants.

Keywords: *Agrobacterium*, maize, *mtlD* gene, transformation.

Classification number: 4.6

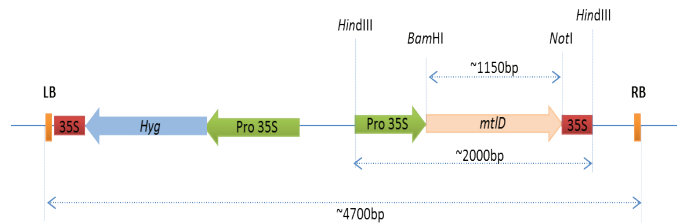
chuyển gen *mtlD* của *E. coli* vào cây thuốc lá, cây chuyển gen biểu hiện *mtlD* cho thấy nồng độ mannitol tăng lên 6 μM/g khối lượng khô [15]. Khi chuyển gen này vào lúa mì, cây chuyển gen có biểu hiện tính chống chịu tốt hơn khi gặp hạn và mặn so với cây không chuyển gen [16]. Gen *mtlD* còn được chuyển vào cà tím [17], cà chua [18], lúa [19], cao lương [20], khoai tây [21, 22] nhằm nâng cao tính chịu hạn, mặn của cây trồng. Với mục tiêu tạo nguyên liệu cho chuyển gen ở cây ngô, gen *mtlD* có nguồn gốc *E. coli*

đã được cải biến mã phù hợp với cây ngô và được gắn vào vector Ti-plasmid pCambia1300 dưới sự điều khiển của promoter 35S [23]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành chuyển gen *mtlD* đã thiết kế vào cây ngô nhằm tạo cây ngô mang gen *mtlD*, phục vụ công tác tạo giống ngô cải thiện tính chịu hạn.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

Chủng *A. tumefaciens* EHA105 mang vector pCAM/35S-*mtlD* được thiết kế bởi Viện Nghiên cứu hệ gen [23]. Cấu trúc của vector mang gen *mtlD* được thể hiện trong sơ đồ hình 1. Phôi non từ giống ngô K7 dùng làm nguyên liệu cho chuyển gen được cung cấp từ Viện Nghiên cứu ngô là dòng đã được đánh giá có khả năng biến nạp gen tốt và có tính chịu hạn bình thường.



Hình 1. Sơ đồ cấu trúc vector pCambia1300 mang gen *mtlD* dưới sự điều khiển của promoter 35S [23]. LB: bờ trái T-ADN; RB: bờ phải T-ADN; Hyg: gen kháng Hygromycin; Pro35S: đoạn khởi đầu phiên mã 35S của *Cauliflower mosaic virus*; 35S: đoạn kết thúc phiên mã 35S; *mtlD*: gen mã hóa mannitol 1-phosphate dehydrogenase; vị trí các điểm cắt giới hạn của enzyme *Bam*HI, *Not*I và *Hind*III.

Phương pháp nghiên cứu

Chuyển gen vào phôi non ngô thông qua *A. tumefaciens*: được tiến hành theo phương pháp của Frame và cs (2006) [24] có cải tiến cho phù hợp với nguồn vật liệu ngô K7 và điều kiện phòng thí nghiệm của chúng tôi. Vi khuẩn *A. tumefaciens* chứa vector tái tổ hợp được nuôi cấy trong môi trường Yeast Extract Peptone (YEP) lỏng có bổ sung kháng sinh thích hợp và lắc ở 200 vòng/phút, 28°C, qua đêm. Dịch huyền phù vi khuẩn được ly tâm với tốc độ 5.000 vòng/phút, ở 4°C trong 5 phút. Loại bỏ dịch trên và hoà tan cặn vi khuẩn bằng môi trường lấy nhiễm có bổ sung acetosyringone (AS). Pha loãng dịch khuẩn cho tới khi đạt được OD₆₀₀ 0,5-1,0. Dịch huyền phù vi khuẩn được sử dụng để lây nhiễm với phôi non của ngô.

Bắp ngô non được thu hái sau 10 ngày tự thụ phấn, phôi non 1-2 mm được tách khỏi bắp và hạt trong điều kiện vô trùng và được lây nhiễm với dịch vi khuẩn có bổ sung AS nồng độ 100μM trong 20 phút. Phôi sau khi lây nhiễm với vi khuẩn được chuyển sang môi trường đồng nuôi cấy. Sau 3 ngày, các phôi đã biến nạp được chuyển sang môi trường

phục hồi trong 7 ngày. Tiếp đó, mô sẹo tái sinh trong giai đoạn này lần lượt được nuôi cấy trên môi trường chọn lọc 1 và chọn lọc 2 chứa kháng sinh hygromycin với hai nồng độ khác nhau (mỗi giai đoạn 14 ngày). Các mô sẹo phôi hoá tạo thành trên môi trường chọn lọc được cấy chuyển sang môi trường tái sinh 1 trong 7 ngày. Sau đó, chuyển sang môi trường tái sinh 2 và liên tục chuyển môi trường mới đến khi mọc chồi. Chồi tái sinh được cấy chuyển sang môi trường tạo cây ra rễ trong khoảng 10-20 ngày. Cây tái sinh khi có 2-3 lá được chuyển ra giá thể để huấn luyện cây trong phòng thí nghiệm, sau đó trồng trong nhà lưới. Khi cây đã cứng cáp đến giai đoạn 5 lá thì thu mẫu lá cho các thí nghiệm tách chiết ADN và PCR. Thành phần từng loại môi trường và điều kiện nuôi cấy từng giai đoạn được trình bày trong bảng 1. Các môi trường sử dụng trong quá trình chuyển gen đều dựa trên môi trường MS [25] và bổ sung các thành phần khác tùy theo mục đích sử dụng.

Bảng 1. Thành phần môi trường và điều kiện nuôi cấy trong thí nghiệm chuyển gen vào phôi ngô [24].

Môi trường	Thành phần	Điều kiện nuôi cấy
Lây nhiễm lỏng	MS (Murashige and Skoog 1962) + 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4D) 1,5 mg/l + L-proline 0,7 g/l + sucrose 68,4 g/l + glucose 36 g/l + AS (100uM) pH 5,5	
Đồng nuôi cấy	MS + 2,4D 2 mg/l + L-proline 0,7 g/l + sucrose 30 g/l + phytagel 2,4 g/l + AgNO ₃ 0,85 mg/l + AS (100µM) pH 5,8	Tối, 21°C, 3 ngày
Nuôi phục hồi	MS + 2,4D 2 mg/l + L-proline 0,7 g/l + sucrose 30 g/l + MES 0,5 g/l + phytagel 2,4 g/l + cefotaxime 100 mg/l + vancomycin 100 mg/l + AgNO ₃ 0,85 mg/l pH 5,8	Tối, 28°C, 7 ngày
Chọn lọc 1	MS + 2,4D 1,5 mg/l + L-proline 0,7 g/l + MES 0,5 g/l + sucrose 30 g/l + phytagel 2,4 g/l + cefotaxime 100 mg/l + vancomycin 100 mg/l + AgNO ₃ 0,85 mg/l + hygromycin 1,5 mg/l pH 5,8	Tối, 28°C, 14 ngày
Chọn lọc 2	MS + 2,4D 1,5 mg/l + L-proline 0,7 g/l + MES 0,5 g/l + sucrose 30 g/l + phytagel 2,4 g/l + cefotaxime 100 mg/l + vancomycin 100 mg/l + AgNO ₃ 0,85 mg/l + hygromycin 3 mg/l pH 5,8	Tối, 28°C, 14 ngày
Tái sinh 1	MS + myo-inositol 100 mg/l + sucrose 60 g/l + phytagel 2,4 g/l + cefotaxime 100 mg/l + vancomycin 100 mg/l + hygromycin 3 mg/l pH 5,8	Tối, 25°C, 7 ngày
Tái sinh 2	MS + myo-inositol 100 mg/l + sucrose 30 g/l + casein 400 mg/l + kinetin 1 mg/l + nước dừa 150 ml/l + phytagel 2,4 g/l pH 5,8	Sáng, 25°C
Môi trường ra rễ	MS + myo-inositol 100 mg/l + sucrose 30 g/l + casein 100 mg/l + NAA 1 mg/l + IBA 0,1 mg/l + phytagel 2,4 g/l pH 5,8	Sáng, 25°C

Các chỉ tiêu theo dõi:

- Tỷ lệ mô sẹo = (Số mô sẹo kháng hygromycin SE2/số phôi biến nạp) x 100%.
- Tỷ lệ tạo chồi tái sinh = (Số chồi tái sinh/số mô sẹo kháng hygromycin SE2) x 100%.
- Tỷ lệ tạo cây hoàn chỉnh = Số cây hoàn chỉnh (số cây trong môi trường ra rễ)/số cây tái sinh.
- Tỷ lệ biến nạp gen = (Số cây sống sót khi ra ruộng/số phôi biến nạp) x 100%.

Tách chiết ADN tổng số từ lá cây ngô: ADN tổng số được tách chiết theo phương pháp của Roger và cs (1985) [26] nhưng có cải tiến cho phù hợp với mô lá ngô. Cụ thể: lá ngô tươi được nghiền thành bột mịn bằng cối chày sứ đã khử trùng trong nitor lỏng. Sau đó, đem chiết (100mM Tris pH 8,0, 1,4M NaCl, 20mM EDTA pH 8,0, 0,2% (v/v) β-mercaptoethanol, 1-2% polyphenolpyrrolidine, 2-4% cetyltrimethyl ammonium bromide) được bổ sung vào ống chứa bột lá với tỷ lệ mẫu/đệm là 1:5. Hỗn hợp được trộn đều và ủ ở 65°C trong 60 phút. Tiếp theo, hỗn hợp được để ổn định ở nhiệt độ phòng và ly tâm ở 10.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C nhằm loại bỏ xác tế bào thực vật. Protein và tạp chất cũng được loại bỏ lần lượt bằng các hỗn hợp phenol/choloroform/isoamyl alcohol (v:v:v = 25:24:1) và choloroform/isoamyl alcohol (v:v = 24:1). ADN sau đó được rửa lại bằng ethanol 96-100% có bổ sung 0,3M CH₃COONa và hòa trong đệm Tris-EDTA để sử dụng làm khuôn cho các phản ứng tiếp theo.

Nhân đoạn gen quan tâm bằng PCR: hiệu quả chuyển gen được đánh giá thông qua các thí nghiệm PCR kiểm tra sự có mặt của gen chuyển trong hệ gen của cây ngô tái sinh. Phản ứng PCR được thực hiện với cặp mồi nhân gen chọn lọc kháng hygromycin được chúng tôi thiết kế có trình tự (mỗi xuôi 5'-ATCGGCACTTTGCATCGG-3', mồi ngược 5'-TACACAGCCATCGGTCCAGAC-3') sẽ nhân đoạn 775 bp và mồi nhân gen đích *mtlD* được chúng tôi thiết kế có trình tự (mỗi xuôi 5'-ACAGATGGATCCAAGGCATTGCATTTTCGGC-3', mồi ngược 5'-AGTGATGCGGCCGCTGCATTGCCTTGTA-3') sẽ nhân đoạn 1.153 bp. Thành phần thực hiện các phản ứng khuếch đại bao gồm: 1X Buffer, 0,4mM dNTPs, 1mM MgCl₂, 0,4mM mỗi mồi, 20 ng ADN genome và 2U Dream taq ADN polymerase (Thermofisher Scientific, Lithuania). Chu trình nhiệt PCR được cài đặt như sau: 95°C/3 phút; (95°C/30 giây, 55°C/45 giây, 72°C/2 phút) x 30 chu kỳ; 72°C/10 phút. Sản phẩm PCR được kiểm tra trên gel agarose 0,8% và nhuộm bằng ethidium bromide.

Các thí nghiệm chuyển gen và đánh giá các nguồn vật liệu chuyển gen được thực hiện trong điều kiện nhà lưới (khu thí nghiệm nhà lưới có cách ly bảo đảm an toàn sinh học). Theo dõi các chỉ tiêu thí nghiệm trong điều kiện nhà lưới (có cách ly đảm bảo an toàn sinh học) của các nguồn

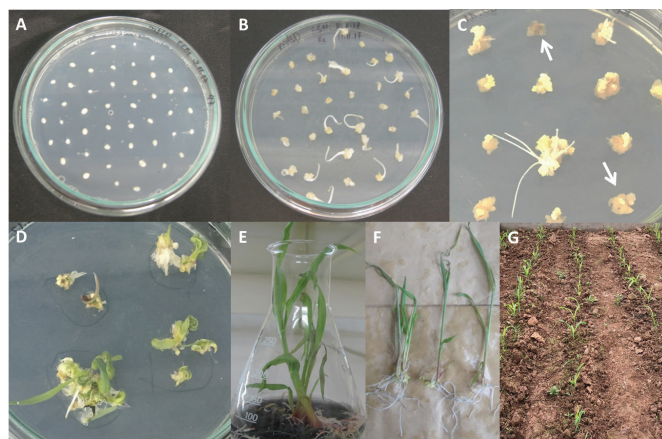
ngô theo hướng dẫn của Trung tâm Cải tạo giống ngô và lúa mì quốc tế (CIMMYT).

Kết quả và thảo luận

Đánh giá khả năng tái sinh cây từ phôi non sau chuyển gen

Vật liệu chuyển gen ban đầu được chúng tôi lựa chọn là phôi non có nguồn gốc từ dòng ngô mô hình K7 - một dòng ngô ưu tú của Viện Nghiên cứu ngô và chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* EHA105 mang vector pCAM/35S-*mtlD* [23]. Trong nghiên cứu chuyển gen thực vật, mức độ tái sinh thành cây hoàn chỉnh của mẫu biến nạp sau các giai đoạn nuôi cấy chọn lọc cũng như sức sống và khả năng sinh sản của cây tái sinh là hết sức quan trọng, quyết định đến hiệu quả quá trình biến nạp. Các giai đoạn chính của quá trình chuyển gen vào phôi ngô thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* được thể hiện trong hình 2. Trải qua 2 giai đoạn lây nhiễm và đồng nuôi cấy với vi khuẩn *A. tumefaciens*, phôi non bắt đầu phân hóa tạo mô sẹo trên môi trường phục hồi (hình 2A, B). Tuy nhiên, số lượng mô sẹo giảm dần đi qua hai lần chọn lọc trên môi trường chứa hygromycin. Nhiều mô sẹo xảy ra hiện tượng hoại tử, chuyển màu nâu và chết đi (hình 2C). Hiện tượng này đã được báo cáo là nguyên nhân làm giảm sự tái sinh cây trồng chuyển gen trong nhiều loại cây trồng [27, 28] nhưng cũng cho thấy quá trình loại bỏ các mô sẹo không mang gen chỉ thị đang diễn ra. Sau chọn lọc, chúng tôi thu được tỷ lệ phần trăm mô sẹo hình thành qua đợt chuyển gen 1 và 2 lần lượt là 17,70 và 13,24% (bảng 2). Tiếp theo, các mô sẹo được nuôi cấy trên hai môi trường tái sinh và môi trường ra rễ để tạo thành cây hoàn chỉnh (hình 2D, E) với tỷ lệ tái sinh trung bình của 2 đợt chuyển gen đạt khoảng 56%. So với một số nghiên cứu tương tự được thực hiện trong nước như của nhóm tác giả Trần Thị Lương và cs (2014) (trung bình đạt 39,15%) [8] hay Huỳnh Thị Thu Huệ và cs (2014) (trung bình đạt 20,18%) [10], tỷ lệ này là khá cao. Khả năng tái tạo cây hoàn chỉnh từ các mô sẹo chuyển gen đã đạt được bước đầu cho thấy tính phù hợp với điều kiện và vật liệu của quy trình chuyển gen và tái sinh cây mà chúng tôi đang áp dụng.

Các cây con tái sinh phát triển hoàn chỉnh được chuyển sang trồng và chăm sóc trong nhà lưới (hình 2F, G). Ngô là một trong những cây dễ bị tổn thương bởi các yếu tố môi trường bất lợi như sâu bệnh và điều kiện thời tiết khắc nghiệt. Do đó, số lượng cây chuyển gen sống sót khi trồng ra đất chúng tôi thu được khá thấp, ở đợt chuyển gen 1 là 25 cây (1,64%) và ở đợt chuyển gen 2 là 19 cây (0,8%). Các cây sống sót được gắn thẻ theo dõi và thu mẫu lá để tiến hành kiểm tra sự có mặt của cấu trúc biểu hiện gen *mtlD* bằng kỹ thuật PCR. Các cây con có hình thái và sinh trưởng khá bình thường đến giai đoạn cây 3-5 lá, tuy nhiên đến giai đoạn muộn hơn một số cây có hiện tượng phun râu và trở cờ lệch nhau, ngoài ra một số cây có một vài bất thường về hình thái như bắp ngoài bao.



Hình 2. Minh họa quá trình biến nạp và tái sinh cây ngô chuyển gen. (A) Phôi non sau 3 ngày được nuôi cấy cộng sinh với vi khuẩn *A. tumefaciens* trong môi trường đồng nuôi cấy; (B) Phôi sau một tuần nuôi cấy trên môi trường phục hồi có bổ sung kháng sinh vancomycin (100 mg/l) và cefotaxim (100 mg/l); (C) Mô sẹo nuôi cấy trên môi trường chọn lọc bổ sung kháng sinh hygromycin, mũi tên trắng chỉ các mô sẹo hoại tử; (D) Các chồi phát sinh từ mô sẹo trên môi trường tái sinh bổ sung chất điều hòa sinh trưởng kinetin (1 mg/l); (E) Cây con tái sinh trong môi trường ra rễ; (F) Cây con chuẩn bị ra bầu đất; (G) Cây được trồng trên đất trong nhà lưới.

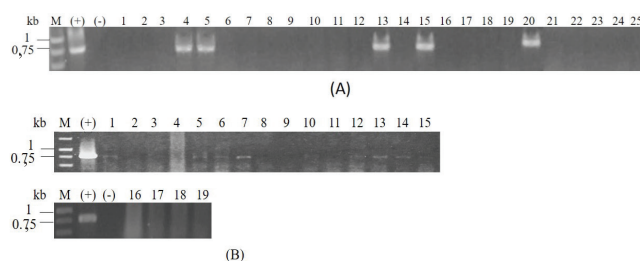
Bảng 2. Thống kê kết quả chuyển gen *mtlD* vào cây mô hình ngô K7.

Đợt chuyển gen	Đồng nuôi cấy	Phục hồi	Chọn lọc 1	Chọn lọc 2	Tái sinh 1	Tái sinh 2	Ra rễ	Ra bầu đất	Tỷ lệ so với số phôi sử dụng	Số cây sống sót khi ra đất	Số cây T ₀ PCR (+) gen đích
Đợt 1	1.520	1.352	993	269	186	101	49	25	0,016	25	5
Đợt 2	2.387	1.680	1.238	316	123	68	43	35	0,014	19	3

Đánh giá gen chuyển từ cấu trúc pCAM/35S-*mtlD* vào cây ngô thể hệ T₀

Hiệu quả biến nạp được đánh giá dựa trên sự có mặt của gen chuyển trong thể chuyển gen. Vì vậy, chúng tôi tiến hành thu mẫu lá trên toàn bộ 44 cây ngô từ 2 đợt chuyển gen ở nhà lưới nhằm tách chiết ADN tổng số và kiểm tra sự có mặt của gen chuyển bằng phương pháp PCR.

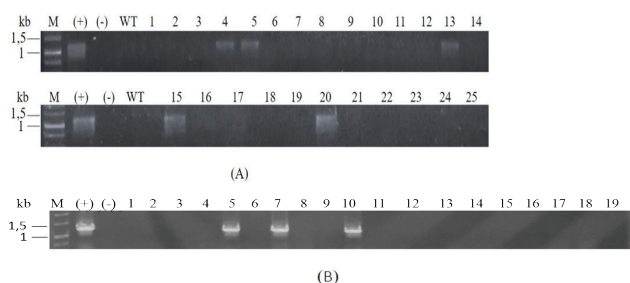
Trước hết, PCR được tiến hành để kiểm tra sự có mặt của gen chỉ thị kháng hygromycin trong các cây ngô chuyển gen pCAM/35S-*mtlD*. Gen chỉ thị được thiết kế nằm trong T-ADN và trên lý thuyết sẽ sát nhập vào hệ gen vật chủ cùng với gen đích *mtlD*. Sự có mặt của gen chỉ thị giúp các thể chuyển gen vượt qua các giai đoạn chọn lọc trong nuôi cấy mô. Cặp mồi chúng tôi thiết kế được sử dụng trong thí nghiệm PCR này khuếch đại vùng mã hóa của gen chỉ thị hygromycin với kích thước lý thuyết là 775 bp. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR thể hiện trên hình 3 cho thấy, có 5/25 cây chuyển gen đợt 1 (giếng 4, 5, 13, 15 và 20, hình 3A) và 8/19 cây chuyển gen đợt 2 dương tính (giếng 1, 5, 6, 7, 10, 12, 13 và 14, hình 2B) với gen chọn lọc. Như vậy,



Hình 3. Kiểm tra sự có mặt của gen chỉ thị hygromycin trong một số cây ngô chuyển gen thế hệ T₀. (A) Kết quả kiểm tra đột chuyển gen 1: (+): sản phẩm PCR từ plasmid pCAM/35S-*mtlD*; (-): sản phẩm PCR với khuôn là nước, 1-25: sản phẩm PCR từ ADN tổng số của các cây ngô chuyển gen thế hệ T₀ (tương ứng với các cây 1-25). (B) Kết quả kiểm tra đột chuyển gen 2: (+): sản phẩm PCR từ plasmid pCAM/35S-*mtlD*; (-): sản phẩm PCR với khuôn là nước, 1-19: sản phẩm PCR từ ADN tổng số của các cây ngô chuyển gen thế hệ T₀ (tương ứng với các cây 1-19).

chúng tôi thu được 13 cây dương tính với gen chọn lọc, chiếm tỷ lệ 29,54% số cây tái sinh sống sót.

Để kiểm tra sự có mặt của cấu trúc biểu hiện gen *mtlD* trong ADN tổng số cây chuyển gen, phản ứng PCR với cặp mỗi nhân đặc hiệu vùng CDS của gen *mtlD* do chúng tôi thiết kế được tiến hành. Kích thước theo lý thuyết của sản phẩm PCR là 1.153 bp. Kết quả điện di ở hình 3 cho thấy đã thu được cây ngô tái sinh mang gen *mtlD*: 5 cây thuộc đột chuyển gen 1 (hình 4A, đường chạy 4, 5, 13, 15, 20) và 3 cây thuộc đột chuyển gen 2 (hình 4B, đường chạy 5, 7, 10) xuất hiện băng ADN có kích thước tương đương với đối chứng dương. Ngoài ra, kết quả PCR với 2 cặp mỗi cho thấy rằng các cây có kết quả dương tính với gen đích cũng cho kết quả dương tính với gen chỉ thị. Như vậy, qua hai đột chuyển gen vào cây mô hình ngô K7, chúng tôi đã sàng lọc được 8/44 cây T₀ mang gen *mtlD*, chiếm tỷ lệ 18,18% cây tái sinh sống sót. Các cây ngô chuyển gen *mtlD* tiếp tục



Hình 4. Kiểm tra sự có mặt của gen đích *mtlD* trong cây ngô chuyển gen thế hệ T₀. (A) Kết quả kiểm tra đột chuyển gen 1: (+): sản phẩm PCR từ plasmid pCAM/35S-*mtlD*; (-): sản phẩm PCR với khuôn là nước, WT: sản phẩm PCR từ ADN tổng số của cây ngô không chuyển gen; 1-25: sản phẩm PCR từ ADN tổng số của các cây ngô chuyển gen thế hệ T₀ (tương ứng với các cây 1-25). (B) Kết quả kiểm tra đột chuyển gen 2: (+): sản phẩm PCR từ plasmid pCAM/35S-*mtlD*; (-): sản phẩm PCR với khuôn là nước, 1-19: sản phẩm PCR từ ADN tổng số của các cây ngô chuyển gen thế hệ T₀ (tương ứng với các cây: 1-19).

được chăm sóc và thu hạt nhằm phục vụ những phân tích, đánh giá khả năng hoạt động và biểu hiện của gen những thế hệ tiếp theo.

Tỷ lệ chuyển gen vào cây ngô không cao do những khó khăn trong quá trình chuyển gen vào thực vật một lá mầm so với thực vật hai lá mầm [29] mặc dù cơ chế chuyển đoạn T-ADN của vi khuẩn *A. tumefaciens* vào hai loại thực vật này được khẳng định là giống nhau. Sự khác biệt về hiệu quả chuyển gen gây ra bởi thành phần cấu trúc thành tế bào, khả năng biệt hóa, phản ứng với các tổn thương, quá trình cảm ứng gen *vir*... của thực vật một lá mầm không giống với thực vật hai lá mầm. Ngoài ra, một số chất chuyển hóa thứ cấp gây ức chế quá trình cảm ứng gen *vir* cần thiết để sát nhập gen ngoại lai đã được tìm thấy ở ngô [30-32].

Với kết quả ban đầu về việc chuyển gen *mtlD* vào cây ngô, chúng tôi hy vọng nếu có sự biểu hiện gen *mtlD* trên cây ngô chuyển gen sẽ giúp cải thiện tính chịu hạn cho cây ngô chuyển gen. Các thí nghiệm đánh giá tiếp theo để khẳng định sự sát nhập của gen chuyển *mtlD* vào cây ngô và sự biểu hiện gen *mtlD* sẽ được thực hiện ở các thế hệ sau.

Kết luận

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã thực hiện việc chuyển gen *mtlD* vào phôi non của dòng ngô K7 thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*. Kết quả đã thu được 25 cây sống sót trong đợt 1, đạt tỷ lệ 1,64% và 19 cây sống sót trong đợt 2, đạt tỷ lệ 0,80% so với số phôi sử dụng, trong đó có 8 cây cho kết quả dương tính với PCR, chiếm tỷ lệ 18,18% số cây tái sinh sống sót.

LỜI CẢM ƠN

Công trình được thực hiện tại Viện Nghiên cứu hệ gen với kinh phí từ đề tài cấp nhà nước “Phân lập thiết kế gen chịu hạn phục vụ công tác tạo giống ngô biến đổi gen” do Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn quản lý giai đoạn 2014-2018. Các tác giả xin chân thành cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] FAOSTAT (2012), *Food Supply*.
- [2] USDA (2018), *FAS Grain: World Markets and Trade*.
- [3] S. Daryanto, et al. (2016), “Global synthesis of drought effects on maize and wheat production”, *PLOS ONE*, **11**(5), e0156362, doi: 10.1371/journal.pone.0156362.
- [4] R.A. Ibrahim, D.M. Shaver (2014), “Transgenic Bt-Plants and the Future of Crop Protection (An Overview)”, *International Journal of Agricultural and Food Research*, **3**(1), pp.14-40.
- [5] ISAAA (2016), *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops*, Ithaca, New York, ISAAA Brief No.52.
- [6] Nguyễn Văn Đồng và cs (2010), “Kết quả bước đầu trong nghiên cứu chuyển gen kháng sâu (*CryIac*) vào phôi non các dòng ngô mô hình”, *Tạp chí Công nghệ sinh học*, **8**(2), tr.173-180.

- [7] Trương Thu Hằng (2013), “Chọn tạo các dòng ngô được chuyển gen kháng sâu (*CryIAC*) thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*”, *Tạp chí Khoa học, Đại học Quốc gia Hà Nội*, **29(3)**, tr.17-29.
- [8] Trần Thị Lương, Nguyễn Thị Thu, Nguyễn Thùy Ninh, Nguyễn Đức Thành (2014), “Chuyển gen *Shrunken 2* (*Sh2*) mã hóa enzyme ADP-glucose pyrophosphorylase vào một số dòng ngô bằng phương pháp chuyển gen thông qua *A. tumefaciens*”, *Tạp chí Sinh học*, **36(1)**, tr.99-109.
- [9] Nguyễn Văn Đồng, Nguyễn Hữu Kiên (2013), “Thiết kế vector biểu hiện gen chịu hạn *NTCB-ZmNF-YB2* ở cây ngô”, *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển nông thôn*, **7**, tr.31-37.
- [10] Huỳnh Thị Thu Huệ, Nguyễn Văn Trường, Bùi Mạnh Minh, Đoàn Thị Bích Thảo, Nguyễn Xuân Thắng, Nông Văn Hải, Bùi Mạnh Cường (2014), “Thiết kế vector biểu hiện mang gen *modiCspB* và chuyển gen này vào cây ngô”, *Tạp chí Công nghệ sinh học*, **12(1)**, tr.125-132.
- [11] I.C. Jang, et al. (2003), “Expression of a bifunctional fusion of the *Escherichia coli* genes for trehalose-6-phosphate synthase and trehalose-6-phosphate phosphatase in transgenic rice plants increases trehalose accumulation and abiotic stress tolerance without stunting growth”, *Plant Physiol.*, **131(2)**, pp.516-524.
- [12] P. Castiglioni, et al. (2008), “Bacterial RNA chaperones confer abiotic stress tolerance in plants and improved grain yield in maize under water-limited conditions”, *Plant Physiol.*, **147(2)**, pp.446-455.
- [13] D.A. Lightfoot, et al. (2007), “Improved drought tolerance of transgenic *Zea mays* plants that express the glutamate dehydrogenase gene (*gdhA*) of *E. coli*”, *Euphytica*, **156(1-2)**, pp.103-116.
- [14] J.M. Stoop, et al. (1996), “Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress”, *Trends in Plant Science*, **1(5)**, pp.139-144.
- [15] B. Karakas, et al. (1997), “Salinity and drought tolerance in mannitol accumulating transgenic tobacco”, *Plant Cell Environ.*, **20(3)**, pp.609-616.
- [16] T. Abebe, et al. (2003), “Tolerance of mannitol-accumulating transgenic wheat to water stress and salinity”, *Plant Physiol.*, **131(4)**, pp.1748-1755.
- [17] V. Prabhavathi, et al. (2002), “Abiotic stress tolerance in transgenic eggplant (*Solanum melongena* L.) by introduction of bacterial mannitol phosphate dehydrogenase gene”, *Mol. Breed.*, **9(2)**, pp.137-147.
- [18] N. Khare, et al. (2010), “Transgenic tomato cv. Pusa Uphar expressing a bacterial mannitol-1-phosphate dehydrogenase gene confers abiotic stress tolerance”, *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, **103**, pp.267-277.
- [19] W.H. Huizhong, et al. (2000), “Salt tolerance of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) with *mtlD* gene and *gutD* gene”, *Chinese. Sci. Bull.*, **45**, pp.18-22.
- [20] M. Maheswari, et al. (2010), “Metabolic engineering using *mtlD* gene enhances tolerance to water deficit and salinity in sorghum”, *Biologia Plantarum*, **54(4)**, pp.647-652.
- [21] H. Rahnama, et al. (2011), “Enhanced salt stress tolerance in transgenic potato plants (*Solanum tuberosum* L.) expressing a bacterial *mtlD* gene”, *Acta. Physiol. Plant*, **33**, pp.1521-1532.
- [22] A. Askari, A. Pepoyan, A. Parsaeimehr (2012), “Salt tolerance of genetic modified potato (*Solanum tuberosum*) cv. Agria by expression of a bacterial *mtlD* gene”, *Adv. Agr. Botany*, **4**, pp.10-16.
- [23] Lê Bắc Việt, Nguyễn Thị Kim Liên, Nguyễn Huy Hoàng, Nông Văn Hải, Huỳnh Thị Thu Huệ (2017), “Thiết kế vector biểu hiện mang gen mã hóa mannitol-1-phosphate dehydrogenase (*mtlD*) từ chủng *E. coli* JM109 để chuyển vào cây ngô”, *Tạp chí Sinh học*, **39(1)**, tr.61-67.
- [24] B.R. Frame, et al. (2006), “Improved *Agrobacterium*-mediated transformation of three maize inbred lines using MS salts”, *Plant Cell Reports*, **25(10)**, pp.1024-1034.
- [25] T. Murashige, F. Skoog (1962), “A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures”, *Physiol. Plant*, **15**, pp.473-497.
- [26] S.O. Rogers, A.J. Bendich (1985), “Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues”, *Plant Molecular Biology*, **5(2)**, pp.69-76.
- [27] G. Hansen (2000), “Evidence for *Agrobacterium* - Induced Apoptosis in Maize cells”, *MPMI*, **13(6)**, pp.649-657.
- [28] A. Karthikeyan, et al. (2012), “*Agrobacterium* - mediated transformation of *indica* rice cv. ADT 43”, *Plant Cell, Tissue and Organ. Culture (PCTOC)*, **109(1)**, pp.153-165.
- [29] P. Sood, A. Bhattacharya, A. Sood (2011), “Problems and possibilities of monocot transformation”, *Biologia Plantarum*, **55(1)**, pp.1-15.
- [30] J. Zhang, et al. (2000), “At the maize/*Agrobacterium* interface: natural factors limiting host transformation”, *Chem. Biol.*, **7**, pp.611-621.
- [31] P. Liu, E.W. Nester (2006), “Indoleacetic acid, a product of transferred DNA, inhibits *vir* gene expression and growth of *A. tumefaciens* C58”, *Proc. Nat. Acad. Sci., USA*, **103**, pp.4658-4662.
- [32] J. Maresh, J. Zhang, D.G. Lynn (2006), “The innate immunity of maize and the dynamic chemical strategies regulating two component signal transduction in *Agrobacterium tumefaciens*”, *ACS Chem. Biol.*, **1**, pp.165-175.