

Xác định sự có mặt và phiên mã gen *ZmLEA14A* ở cây chuyển gen *Nicotiana tabacum* dòng NiC9-1

Hà Hồng Hạnh¹, Bùi Mạnh Minh¹, Lê Thị Thu Hiền^{1,2}, 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

Ngày nhận bài 24/5/2019; ngày chuyển phân biện 30/5/2019; ngày nhận phân biện 3/7/2019; ngày chấp nhận đăng 15/7/2019

Tóm tắt:

Chức năng của các protein LEA trong thực vật được quan tâm nhiều là chức năng bảo vệ thành tế bào trước các stress phi sinh học. Việc ứng dụng kỹ thuật di truyền để chuyển các gen *LEA* vào thực vật nhằm cải tiến tính chống chịu khô hạn đã được tiến hành nhiều năm nay. Đối với cây ngô, nhóm gen *LEA* được xác định gồm 9 nhóm phân bố đều trên 10 nhiễm sắc thể của ngô. Trong đó, gen *ZmLEA14A* được xác định nằm trong nhóm 5C chứa một khung đọc mở mã hóa cho một chuỗi polypeptide với 152 axit amin. Trong nghiên cứu này, gen *ZmLEA14A* phân lập từ cây ngô địa phương Tẻ vàng 1 đã được chuyển vào cây thuốc lá *Nicotiana tabacum* dòng NiC9-1, gen *ZmLEA14A* này nằm trong vector biểu hiện thực vật pCAM/35S-*ZmLEA14A*-35S dưới sự điều khiển của promoter cơ định 35S. Các cây thuốc lá chuyển gen được tạo ra phát triển tốt ở các giai đoạn khác nhau, với tỷ lệ sống trong phòng thí nghiệm là 89,2%. Khi sử dụng 7 cây chuyển gen để kiểm tra bằng phương pháp PCR cho thấy, gen *ZmLEA14A* đã được chuyển thành công vào hệ gen thuốc lá và trong đó 3 cây được kiểm tra thêm bằng RT-PCR cho thấy gen đã biểu hiện ở mức phiên mã. Như vậy, cấu trúc mang gen này đã có thể sử dụng để chuyển gen vào cây trồng đích khác nhằm tạo cây trồng mang gen *ZmLEA14A* được tăng cường khả năng chịu hạn.

Từ khóa: chịu hạn, chuyển gen, thuốc lá, *ZmLEA14A*.

Chỉ số phân loại: 4.6

Đặt vấn đề

Chức năng của các protein LEA trong thực vật được quan tâm nhiều là chức năng bảo vệ thành tế bào trước các stress phi sinh học. Từ nhiều năm nay, việc ứng dụng kỹ thuật di truyền với các gen *LEA* nhằm cải tiến tính chống chịu khô hạn cho thực vật trong điều kiện đồng ruộng cũng đã được nghiên cứu ở lúa [1] hay gen HVA1 mã hóa protein LEA nhóm 3 của cây lúa mạch (*Hordeum vulgare* L.) đã chuyển nạp thành công vào cây lúa để tăng cường tính chống chịu khô hạn và mặn trong điều kiện nhà lưới [2]. Nghiên cứu của Li và Cao (2016) đã thực hiện phân tích so sánh hệ gen ở ngô, bao gồm quan hệ phát sinh chủng loại, vị trí trên nhiễm sắc thể, sự lặp gen, cấu trúc gen và thiết lập hồ sơ biểu hiện của họ gen *LEA*. Tổng cộng 32 gen *LEA* đã được xác định ở ngô và dựa trên các thành phần cấu trúc khác nhau, protein LEA được chia thành 9 nhóm. Tổ chức gen và thành phần cấu trúc của các thành viên gen *LEA* bảo thủ cao trong mỗi nhóm, các gen *LEA* phân bố đều trên 10 nhiễm sắc thể của ngô, và hiện tượng chuyển vị, lặp đoạn hay lặp đoạn nối tiếp đã góp phần mở rộng họ gen *LEA*. Nghiên cứu này đã dự đoán một gen *LEA* mã hóa cho 1 protein LEA nhóm 5 của ngô nằm trên nhiễm sắc thể số 8 và có chứa domain LEA-2 [3].

Trong nghiên cứu trước [4], một đoạn ADN mang mã có khả năng mã hóa cho một protein LEA trên giống ngô địa phương

Tẻ vàng 1 đã được phân lập và xác định trình tự. Đoạn trình tự *ZmLEA14* này có độ dài 693 bp với 1 khung đọc mở mã hóa cho một chuỗi polypeptide với số lượng 152 axit amin. Phân tích trình tự BLAST trên NCBI cho thấy, trình tự này giống tới 99% so với gen *LEA14A* của ngô (accession number NM_001159174), tiếp theo là gen *LEA14A* của cây cao lương (*Shorghum bicolor*) (XM_002454858.2) và 1 gen giống *LEA14A* của kê đuôi cáo (tỷ lệ tương đồng lần lượt 93 và 87%). Protein mã hóa bởi gen *ZmLEA14tv* được dự đoán có khối lượng phân tử khoảng 15,96 kDa với điểm đẳng điện là 6,08. Chỉ số GRAVY và chỉ số bất định của protein *ZmLEA14tv* lần lượt là 0,047 và 16,01 cho thấy đây là protein ổn định và có mức độ ưa nước rất cao. Dựa theo tìm kiếm trên InterProSca, protein có chứa một domain bảo thủ “LEA_2”(PF03186) sẽ phân vào nhóm protein LEA 5C theo hệ thống phân loại của Battaglia. Phân tích thành phần amino acid cho thấy, gen *ZmLEA14A* phân lập từ cây ngô địa phương Tẻ vàng 1 chứa hàm lượng thấp các axit amin phân cực (23,2%) và hàm lượng cao các axit amin không ưa nước (47,02%). Trình tự protein *ZmLEA14tv* thể hiện tính tương đồng cao với các protein nhóm 5C khác, thể hiện sự bảo thủ và mối quan hệ tiến hóa lâu dài giữa các protein này. Một cấu trúc vector pCAM/35S-*ZmLEA14A*-35S đã được chúng tôi thiết kế gồm vùng mang mã của gen *ZmLEA14A* và gắn thêm đoạn peptide cmyc và KDEL tạo nên vùng gen tái tổ hợp, chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* EHA105 mang vector trên đã

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

Verifying the presence and transcription of *ZmLEA14A* gene in *Nicotiana tabacum* line NiC9-1

Hong Hanh Ha¹, Manh Minh Bui¹, Thi Thu Hien Le^{1,2},
Thi Thu Hue Huynh^{1,2*}

¹Institute of Genome Research, VAST

²Graduate University of Science and Technology, VAST

Received 24 May 2019; accepted 15 July 2019

Abstract:

The function of LEA proteins in plants that has received much attention recently is the cell wall protection against abiotic stresses. Improving the expression of LEA genes to enhance plant drought tolerance has been carried out by various genetic engineering applications for many years. In maize, the LEA genes are evenly distributed over ten chromosomes and classified into nine major groups. Among these LEA genes, *ZmLEA14A* belongs to 5C group and encodes for an open reading frame (ORF) of a 152-amino-acid polypeptide chain. In the current study, the *ZmLEA14A* gene was isolated from Tevang1, a drought-tolerant maize landrace, and transferred into the NiC9-1 tobacco line. The expression of this transgene was driven under the control of a minimised 35S promoter. The transgenic tobacco plants developed normally at all different growth stages with a survival rate of 89.2% in the laboratory condition. The *ZmLEA14A* gene was successfully inserted into the tobacco genome, and the presence of the transgene was verified in 7 transgenic lines by PCR. Applying the RT-PCR technique in three transgenic lines showed that the *ZmLEA14A* gene was currently expressed at the transcription level. In conclusion, the structure harboring the *ZmLEA14A* gene could be used to transfer genes to other target crops to improve the drought tolerance.

Keywords: drought tolerance, gene transfer, tobacco, *ZmLEA14A*.

Classification number: 4.6

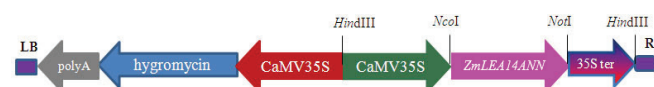
được tạo ra làm nguyên liệu chuyển gen thực vật. Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày kết quả chuyển ổn định gen *ZmLEA14A* từ cấu trúc pCAM/35S-*ZmLEA14A*-35S vào cây thuốc lá *N. tabacum* nhằm kiểm tra sự hoạt động của gen ở cây mô hình.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu nghiên cứu

Hạt giống thuốc lá *N. tabacum* NiC9-1 do Viện Kinh tế Kỹ thuật Thuốc lá cung cấp.

Chủng vi khuẩn: *A. tumefaciens* EHA105 mang vector pCAM/35S-*ZmLEA14A*-35S (hình 1) do Phòng Đa dạng sinh học hệ gen, Viện Nghiên cứu Hệ gen cung cấp. Các cặp môi sử dụng được trình bày ở bảng 1.



Hình 1. Sơ đồ vector pCAM/35S-*ZmLEA14A*-35S.

Bảng 1. Các cặp môi sử dụng.

Tên môi	Trình tự
HygromycinF	5'- AAAGCCTGAACTCACCGC-3'
HygromycinR	5'- GCTTCCACTATCGGCGA-3'
35S promoter F	5'- CACTGACGTAAGGGATGACGC-3'
ZmLEA14ANcoIF	5'- ATTACCATGGCGCAGTTGGTG-3'
cmcyKDELR	5'- TATCGACGGATCGGGCTAGAGTTCG-3'

Phương pháp nghiên cứu

Tạo nguyên liệu chuyển gen: khử trùng hạt bằng khí clo trong 4h và gieo hạt trên môi trường MS (100 hạt/bình) [5]. Sau 4 ngày hạt bắt đầu nảy mầm và khi cây phát triển được 1 tuần, đánh giá tỷ lệ nảy mầm và cấy chuyển sang môi trường MS mới.

Tạo dịch huyền phù vi khuẩn *A. tumefaciens*: một khuẩn lạc đơn của chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* mang vector chuyển gen được chọn để cấy vào 10 ml môi trường LB lỏng có bổ sung kháng sinh kanamycin 50 mg/l và rifamycin 50 mg/l, nuôi qua đêm ở 28°C. Khoảng 2 ml dịch huyền phù vi khuẩn được chuyển sang 50 ml môi trường LB lỏng (không bổ sung kháng sinh) nuôi phục hồi trong 4h. Tế bào vi khuẩn được ly tâm 5.000 vòng/phút trong 10 phút ở 4°C để thu cặn. Cặn khuẩn được hòa tan trong môi trường 1/2 MS lỏng, pH=5,8 đến mật độ khuẩn đạt giá trị $OD_{600nm}=0,7$.

Chuyển gen vào lá thuốc lá thông qua *A. tumefaciens*: các lá bánh tẻ có kích thước vừa phải ở cây con khỏe mạnh 2 tuần tuổi được chọn để cắt thành các mảnh có kích thước khoảng 0,5 cm. Sau đó, các mảnh lá này được đặt trong môi trường 1/2 MS lỏng trước khi biến nạp để tránh bị khô. Các mảnh lá được ngâm vào dịch huyền phù vi khuẩn, $OD_{600nm}=0,7$ trong 10 phút, lắc nhẹ. Mẫu lá được thấm khô bằng giấy thấm khử trùng và đặt lên môi trường đồng nuôi cây CT1 (MS + BAP 1 mg/l) 3 ngày trong tối. Sau đó, các mảnh lá được đặt lên giấy thấm hết dịch khuẩn và chuyển lên môi trường tạo chồi CT2 (MS + BAP 1mg/l + hygromycin). Sau

3-4 tuần, các cụm chồi nhỏ xuất hiện từ mép các mảnh lá được tách ra và tiếp tục cấy lên môi trường tạo chồi mới. Các chồi thật phát triển được tách thành từng chồi riêng rẽ và cấy lên môi trường ra rễ CT3 (MS + NAA 0,1 mg/l + hygromycin). Cây phát triển hoàn chỉnh trong bình sẽ được chuyển ra trồng ở bầu đất.

Kiểm tra cây T0 chuyển gen bằng PCR: phương pháp tách chiết ADN tổng số từ lá non thuốc lá của cây 1,5 tháng tuổi được thực hiện theo Michels và cs (2003) [6]. PCR của các dòng thuốc lá chuyển gen được thực hiện với cặp môi hygromycinF/R đặc hiệu cho gen chỉ thị *Hyg* có kích thước 984 bp và nhân gen *ZmLEA14A* với cặp môi 35S promoter và *cmcyKDEL*R đoạn có kích thước 537 bp, trình tự môi được trình bày tại bảng 1. Thành phần phản ứng gồm: 3,35 µl DEPC treated water, 1,5 µl đệm PCR 10X, 1 µl MgCl₂ 25 mM, 1 µl dNTPs 10 mM, 1 µl hygromycinF 10 pM, 1 µl hygromycinR 10 pM hoặc 1 µl 35S promoterF 10 pM - 1 µl *cmcyKDEL*R 10 pM, 1 µl DNA, 0,15 µl *Taq* polymerase 5 U/µl. Phản ứng được diễn ra với chu trình nhiệt như sau: 95°C - 3 phút; (95°C - 30 giây; 52°C - 1 phút; 72°C - 1 phút) x 30 chu kỳ; 72°C - 10 phút và kết thúc ở 4°C. Sản phẩm PCR có kích thước 984 và 657 bp được phát hiện trên gel agarose 0,8%.

Kiểm tra cây T0 chuyển gen bằng RT-PCR: ARN tổng số từ mẫu lá của cây thuốc lá chuyển gen được tách chiết theo hướng dẫn của bộ Kit Purelink™ Plant RNA Reagent. Sau đó, mARN được tách chiết theo hướng dẫn của bộ Kit FastTrack® MAG mRNA Isolation của Hãng Invitrogen và được sử dụng làm khuôn cho phản ứng RT-PCR. cADN sợi đơn được tổng hợp từ khuôn của mARN bằng Kit tổng hợp cADN Affymetrix của Hãng Invitrogen. Sản phẩm cADN sợi đơn được sử dụng làm khuôn để nhân gen.

Phản ứng nhân gen *Hyg* và gen *Zmlea14A* từ cDNA sử dụng cặp môi hygromycinF/R, hoặc cặp môi *ZmLEA14ANcoIF/cmcyKDEL*R có thành phần gồm 4,75 µl H₂O, 1,5 µl đệm PCR 10 X, 0,5 µl MgCl₂ 25 mM, 1,5 µl dNTPs 10 mM, 0,5 µl hygromycinF 10 pM, 0,5 µl hygromycinR 10 pM hoặc 0,5 µl *ZmLEA14ANcoIF* 10 pM - 0,5 µl *cmcyKDEL*R, 1 µl cDNA, 0,5 µl DMSO, 0,15 µl *Taq* polymerase 5 U/µl. Phản ứng được thực hiện trên máy GeneAmp®PCR Systems 9700 với chu trình nhiệt như sau: 95°C - 3 phút; (95°C - 30 giây; 54°C - 1 phút; 72°C - 1 phút) x 35 chu kỳ; 72°C - 8 phút và kết thúc ở 4°C. Sản phẩm PCR có kích thước dự kiến 984 và 537 bp được phát hiện trên gel agarose 0,8%.

Kết quả và thảo luận

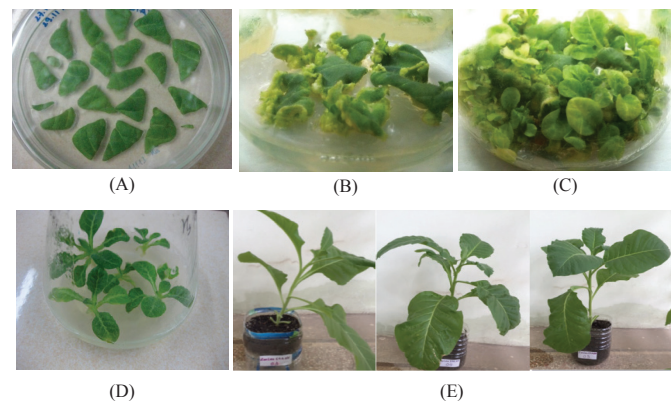
Tạo nguyên liệu thực vật cho thí nghiệm chuyển gen

Theo Banerjee và cs (2006), mảnh lá bánh tẻ là nguyên liệu thích hợp để chuyển gen vào cây thuốc lá. Hạt thuốc lá dòng NiC9-1 được khử trùng bằng khí clo trước khi gieo lên môi trường MS để nảy mầm trong điều kiện vô trùng [7]. Theo Văn và cs (2008, 2009), dung dịch Javel thương phẩm nồng độ 30% có thể sử dụng để loại nấm mốc và vi khuẩn trên hạt thuốc lá [8, 9]. Phương pháp này đạt hiệu quả khử trùng 100%, cho tỷ lệ nảy mầm cao trên 90%. Tuy nhiên, đối với hạt có kích thước nhỏ như

hạt thuốc lá, việc lác rửa nhiều lần tiêu tốn nhiều thời gian cũng như làm mất một số lượng hạt đáng kể. Trong thí nghiệm này, hạt thuốc lá NiC9-1 được khử trùng bằng khí clo theo phương pháp của Topping (1988), nguồn khí clo tạo ra từ phản ứng giữa dung dịch HCl và Javel sẽ khử trùng bề mặt các hạt thuốc lá [10]. Các cây con sau khoảng 4 tuần trên môi trường MS có kích thước lá 4-6 cm là nguồn nguyên liệu tốt nhất để tái sinh và chuyển gen ở cây thuốc lá.

Đồng nuôi cấy với dung dịch *A. tumefaciens* và cảm ứng tạo cụm chồi

Đối với giống NiC9-1, các mảnh lá hình vuông kích thước khoảng 0,5 cm được lác nhẹ trong dịch huyền phù vi khuẩn làm tăng thể tích tiếp xúc giữa vết thương thực vật và dịch khuẩn, là một trong những biện pháp có thể làm tăng khả năng xâm nhập của vi khuẩn vào trong tế bào thực vật, dẫn tới tăng hiệu quả chuyển gen. Do vector pCAM/35S-*ZmLEA14A*-35S có mang đoạn gen kháng kanamycine, nên các môi trường sau biến nạp đều được bổ sung 50 mg/l kanamycine để chọn lọc các cụm chồi chuyển gen. Trong nghiên cứu này, những kết quả về cụm chồi/cây đẻ cập đến là những cụm chồi/cây sống sót trên môi trường chọn lọc có chứa kanamycine. Thí nghiệm chuyển gen *ZmLEA14A* vào cây thuốc lá NiC9-1 được lặp lại 2 lần, mỗi lần với 30 mảnh lá nguyên liệu. Sau 10 ngày tại những vết cắt ở các mảnh lá xuất hiện những cụm tế bào cứng, có màu xanh lá (hình 2B). Với 30 mảnh lá/lần biến nạp (lặp lại thí nghiệm 2 lần) thu được 49 mảnh lá có cảm ứng, đạt tỷ lệ khoảng 81,6% (bảng 2). Song song với thí nghiệm chuyển gen, thí nghiệm đối chứng được thiết lập bằng cách đặt các mảnh lá thuốc lá NiC9-1 trực tiếp lên môi trường CT1 và CT1 có bổ sung kháng sinh diệt khuẩn và kháng sinh chọn lọc. Toàn bộ mảnh lá không chuyển gen được đặt lên môi trường có bổ sung kháng sinh đều vàng dần và chết. Trong số 8 mảnh lá ở 2 lần thí nghiệm đặt lên môi trường cảm ứng không bổ sung kháng sinh có 7 mảnh lá tạo mô sẹo, đạt tỷ lệ 87,5%.



Hình 2. Các giai đoạn phát triển của cây *N. tabacum* chuyển gen *ZmLEA14A*. (A) Mảnh lá đặt trên môi trường cảm ứng; (B) Cụm chồi xuất hiện trên môi trường chọn lọc; (C) Tách chồi chuyển sang môi trường ra rễ; (D) Cây phát triển hoàn chỉnh trong bình; (E) Cây phát triển ngoài bầu đất.

Bảng 2. Kết quả cảm ứng chồi từ mảnh lá và kết quả tạo chồi.

Lô thí nghiệm	Số lần lặp x Số mẫu thí nghiệm	Số mẫu cảm ứng	Tỷ lệ (%)	Số mẫu tạo chồi	Tổng số chồi	Số chồi trung bình
pCAM/35S-ZmLEA14A	2x30	49	81,6	43	126	3,2±0,25
WT1	2x4	0	0	0	0	0
WT2	2x4	7	87,5	6	21	3,4±0,25

Ghi chú: WT1: mảnh lá thuốc lá không chuyển gen đặt lên môi trường có bổ sung kháng sinh; WT2: mảnh lá thuốc lá không chuyển gen đặt lên môi trường không bổ sung kháng sinh.

Sau khoảng 2 tuần, bắt đầu quan sát được những chồi nhỏ. Tách các chồi nhỏ và cấy trên môi trường MS cơ bản, không bổ sung chất điều khiển sinh trưởng. Sau 3 tuần, 100% mảnh lá lô không chuyển gen đều thu được chồi, với tỷ lệ trung bình là 3,4±0,25 chồi/mảnh lá. Số lượng mẫu tạo chồi là 43 với số chồi trung bình 3,2±0,25 chồi/mảnh lá (bảng 2, hình 2C). Như vậy, không có sự khác biệt đáng kể trên các lô cây chuyển gen và không chuyển gen, chứng tỏ quá trình tái sinh cây thuốc lá thiết lập trong thí nghiệm này có hiệu quả.

Tạo rễ và phát triển cây hoàn chỉnh

Tạo rễ là khâu cuối cùng trong nuôi cấy *in vitro* và có ý nghĩa quan trọng đối với kỹ thuật chuyển gen ở thực vật. Vẫn tiếp tục lặp lại quy trình tái sinh thuốc lá đã công bố của Vân và cs (2008, 2009), môi trường MS bổ sung 0,1 mg/l NAA được thử nghiệm tạo rễ thuốc lá NiC9-1 *in vitro*. Sau 4-5 tuần, quan sát thấy rễ xuất hiện ở hầu hết các chồi, tỷ lệ gần 90% (bảng 3, hình 2D). Các chồi đều phát triển xanh tốt và tạo nhiều lá mới. Quan sát thấy các chồi không chuyển gen trên môi trường đối chứng cũng có quá trình tạo rễ tương tự. Các cây có 4-8 lá và 3-5 rễ được lựa chọn để chuyển ra môi trường hỗn hợp đất/trấu theo tỷ lệ 1/1. Kết quả cho thấy, loại giá thể (đất/trấu với tỷ lệ 1/1) cho tỷ lệ cây sống cao lên đến 89,2%.

Bảng 3. Kết quả chồi ra rễ và phát triển cây hoàn chỉnh.

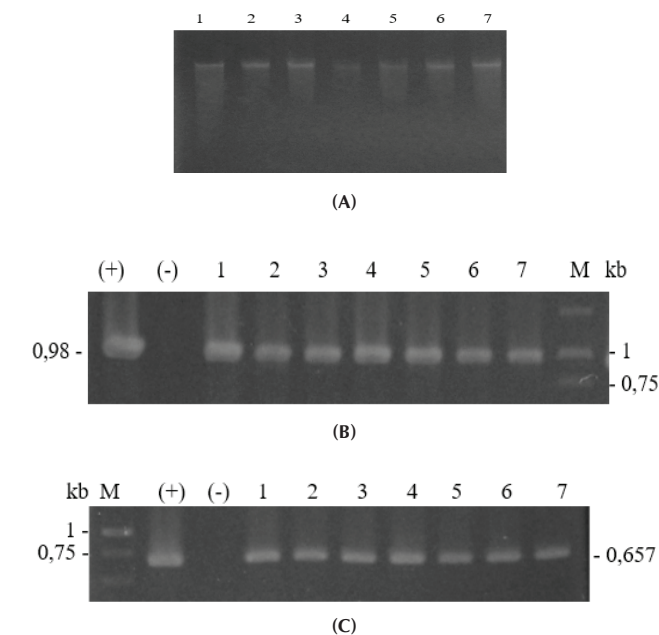
Lô thí nghiệm	Số chồi cây trên môi trường ra rễ	Số chồi ra rễ	Số cây trong phòng thí nghiệm	Số cây sống sót	Tỷ lệ (%)
pCAM35S-ZmLEA14A	126	110	110	99	89,2
WT1	0	0	0	0	0
WT2	21	21	21	19	90,4

Ghi chú: WT1: mảnh lá thuốc lá không chuyển gen đặt lên môi trường có bổ sung kháng sinh; WT2: mảnh lá thuốc lá không chuyển gen đặt lên môi trường không bổ sung kháng sinh.

Kiểm tra sự có mặt và biểu hiện của gen chuyển bằng PCR và RT-PCR

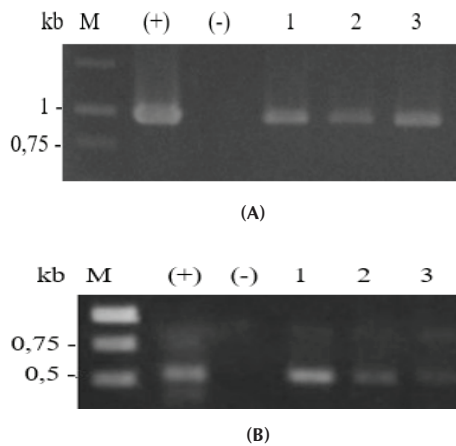
Trước tiên, 7 cây thuốc lá chuyển gen 1,5 tháng tuổi phát triển bình thường trên môi trường đất được chọn để tách chiết ADN tổng số từ lá non. Ảnh điện di cho thấy sản phẩm ADN tổng số được tách chiết khá sạch và nguyên vẹn, không lẫn tạp chất, ít bị phân hủy, đảm bảo đạt yêu cầu cho các thí nghiệm tiếp theo (hình 3A). Phản ứng PCR được thực hiện với khuôn là mẫu ADN tổng số tách từ lá cây thuốc lá các dòng chuyển gen sử dụng cặp mồi

là Hygromycin_F/R để nhân gen vùng gen chỉ thị kháng hygromycin (984 bp). Sản phẩm PCR được kiểm tra thông qua điện di trên gel agarose 0,8% và kết quả điện di cho thấy 7 cây thuốc lá chuyển gen đều xuất hiện sản phẩm PCR đặc hiệu, có kích thước khoảng 984 bp như tính toán lý thuyết (hình 3B). Các cây thuốc lá chuyển gen *ZmLEA4A* dương tính khi PCR với cặp mồi HygromycinF/R được tiếp tục kiểm tra bằng cặp mồi 35S promoterF/cmycDKELR để nhân đoạn gen *ZmLEA14A*+cmycKDEL (657 bp). Kết quả trên hình 3C cho thấy sản phẩm PCR đặc hiệu đã xuất hiện ở 7 cây thuốc lá thí nghiệm. Như vậy, gen *Hyg* và *ZmLEA14A* có mặt trong hệ gen 7 cây thuốc lá chuyển gen.



Hình 3. PCR kiểm tra sự có mặt của gen *Hyg* và gen *ZmLEA14A* trên các cây thuốc lá T0. (A) Điện di ADN tổng số tách từ các mẫu thuốc lá chuyển gen; **(B và C)** Kết quả nhân gen *Hyg* và *ZmLEA14A*: (+) Sản phẩm PCR từ plasmid pCAM/35S-ZmLEA14A-35S; (-) Sản phẩm PCR từ ADN của cây wild type; 1-7. Sản phẩm PCR từ ADN của các cây thuốc lá chuyển gen *ZmLEA14A*.

Để đánh giá khả năng biểu hiện phiên mã của gen chuyển trong cấu trúc chứa gen *ZmLEA14A*, chúng tôi đã tiến hành tách chiết ARN của 3 dòng thuốc lá chuyển gen số 1, 2, 3 và một dòng wild type (-). Cặp mồi HygromycinF/R được sử dụng cho phản ứng RT-PCR nhân gen *Hyg*. Kết quả cho thấy, 3 dòng chuyển gen đều xuất hiện băng ADN có kích thước gần 1 kb và băng đối chứng dương (+), chứng tỏ 3 dòng thuốc lá chuyển gen có sự phiên mã của gen *Hyg* ở mức độ mRNA (hình 4A). Sau đó, chạy phản ứng RT-PCR với cặp mồi *ZmLEA14ANcoIF* và *cmycKDEL*R để kiểm tra sự phiên mã gen *ZmLEA14A*. Kết quả điện di cho thấy, xuất hiện băng ADN kích thước trên 0,5 kb (537 bp) và bằng với đối chứng dương (+), như vậy đã có sự phiên mã của gen *ZmLEA14A* ở cây thuốc lá (hình 4B).



Hình 4. RT-PCR kiểm tra sự có mặt của gen *Hyg* và gen *ZmLEA14A* trên các cây thuốc lá. (A và B) Kết quả nhân gen *Hyg* và *ZmLEA14A*: (+) Sản phẩm PCR từ plasmid pCAM/35S-*ZmLEA14A*-35S; (-) Sản phẩm PCR từ cDNA của cây wild type; 1-3. Sản phẩm PCR từ cDNA của các cây thuốc lá chuyển gen *ZmLEA14A*.

Trong lĩnh vực chuyển gen thực vật, để kiểm tra sự biểu hiện của vector thực vật đã thiết kế, cây thuốc lá được xem xét như là loại cây mô hình phục vụ cho các nghiên cứu đánh giá chức năng gen, bởi vì hệ thống tái sinh và tiếp nhận gen ngoại lai của cây thuốc rất hiệu quả, thời gian phân hóa từ mô đến tạo cây hoàn chỉnh khá ngắn, mặt khác cây thuốc lá là cây ngắn ngày, dễ trồng và chăm sóc nên dễ dàng thu được hạt để nghiên cứu các thế hệ tiếp theo. Sau khi đã có kết quả biểu hiện của gen trong cây mô hình thì thực hiện việc chuyển gen vào cây đích. Từ năm 1986, gen *CP* phân lập từ virus khảm thuốc lá (TMV) đã được sử dụng để chuyển vào cây thuốc lá, gen *CP* biểu hiện tốt cho thấy bệnh khảm thuốc lá chậm phát triển và hơn 50% cây chuyển gen không phát triển các triệu chứng bệnh [11]. Nội độc tố từ *Bacillus thuringiensis* (Bt) được biểu hiện trong thuốc lá cho thấy cây có khả năng kháng côn trùng bướm [12]. Tại Việt Nam từ năm 1989, Nguyễn Liên Chi và cs đã chuyển thành công gen kháng kanamycin vào mô thuốc lá (*Nicotiana tabacum*) bằng vi khuẩn *A. tumefaciens* [13]. Năm 2013, Bùi Văn Thắng và cs đã tạo được cây thuốc lá chuyển gen *codA* mã hóa choline oxidase tăng cường khả năng chịu mặn cho cây [14]. Hà Hồng Hạnh và cs (2013) cũng đã phân lập gen mã hóa chitinase chuyển gen và kiểm tra sự biểu hiện của gen trong cây thuốc lá ở mức độ RT-PCR trong một nghiên cứu nhằm tạo cây chuyển gen có khả năng kháng nấm [15]. Việc chuyển các gen có liên quan đến chức năng bảo vệ tế bào thuộc nhóm gen *LEA* đã được thực hiện ở nhiều nghiên cứu thử nghiệm trên cây mô hình như gen mã hóa protein 5C LEA của cây lạc đã được chuyển gen và biểu hiện ở thuốc lá [16] hay gen SiLEA14 từ cây kê vàng (*S. Italica*) được chuyển gen và biểu hiện trên cây *Arabidopsis* [17] nhằm kiểm tra khả năng tăng cường sức chống chịu cho cây. Như vậy, trong nghiên cứu này việc tạo cây thuốc lá có sự biểu hiện gen chuyển *ZmLEA14A* cho thấy các cấu trúc đã hoạt động trên cây thuốc lá là phù hợp với những nghiên cứu đã có. Cấu trúc này có thể sử dụng để chuyển gen vào cây trồng đích khác như lúa, ngô nhằm tạo cây trồng mang gen *ZmLEA14A* được tăng cường biểu hiện.

Kết luận

Trong nghiên cứu này, gen *ZmLEA14A* đã được chuyển thành công vào cây thuốc lá dòng Nic9-1. Các cây thuốc lá chuyển gen phát triển tốt ở các giai đoạn khác nhau, với tỷ lệ cây sống sót trong phòng thí nghiệm là 89,2%. Trong số các cây chuyển gen, có 7 cây biểu hiện dương tính với phương pháp PCR cho thấy gen *ZmLEA14A* đã được chuyển thành công vào hệ gen thuốc lá, trong đó 3 cây được kiểm tra bằng RT-PCR cho thấy gen *ZmLEA14A* biểu hiện ở mức phiên mã. Như vậy, cấu trúc mang gen này có thể sử dụng để chuyển gen vào cây trồng đích khác nhằm tạo ra cây trồng mang gen *ZmLEA14A* được tăng tính chịu hạn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] B. Xiao, et al. (2007), "Over-expression of a *LEA* gene in rice improves drought resistance under the field conditions", *Theor. Appl. Genet.*, **115**(1), pp.35-46.
- [2] D. Xu, et al. (1996), "Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, *HVA1* from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice", *Plant Physiology*, **110**, pp.249-257.
- [3] X. Li, J. Cao (2016), "Late embryogenesis abundant (*LEA*) gene family in maize: identification, evolution, and expression profile", *Plant Mol. Biol.*, **34**(1), pp.15-28.
- [4] Bui Manh Minh, et al. (2019), "A *LEA* gene from a Vietnamese maize landrace can enhance drought tolerance of transgenic maize and tobacco", *Agronomy*, **9**(2), doi:10.3390/agronomy902006.
- [5] T. Murashige, F. Skoog (1962), "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures", *Physiol. Plant*, **15**(3), pp.473-497.
- [6] A. Michels, et al. (2003), "Extraction of high-quality genomic DNA from latex-containing plants", *Analytic Biochem.*, **315**(1), pp.85-89.
- [7] A.K. Banerjee, et al. (2006), "Efficient production of transgenic potato (*S. tuberosum* L.ssp. andigena) plants via *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation", *Plant Science*, **170**, pp.732-738.
- [8] Phạm Thị Vân, Nguyễn Văn Bắc, Lê Văn Sơn, Chu Hoàng Hà, Lê Trần Bình (2008), "Tạo cây thuốc lá kháng bệnh virus khảm dưa chuột bằng kỹ thuật RNAi", *Tạp chí Công nghệ sinh học*, **6**(4A), tr.679-687.
- [9] Phạm Thị Vân, Nguyễn Minh Hưng, Hà Việt Cường, Lê Văn Sơn, Lê Trần Bình, Chu Hoàng Hà (2009), "Tạo cây thuốc lá kháng virus TMV bằng kỹ thuật RNAi", *Hội thảo quốc gia bệnh hại thực vật Việt Nam*, tr.32-40.
- [10] J.F. Topping (1988), "Tobacco transformation", *Plant Virology Protocols, Methods in Molecular Biology*, **81**, pp.365-372.
- [11] P. Powell-Abel, et al. (1986), "Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene", *Science*, **232**, pp.738-743.
- [12] K.A. Barton, et al. (1987), "*Bacillus thuringiensis* (Bt) - endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to Lepidopteran insects", *Plant Physiol.*, **85**, pp.1103-1109.
- [13] Nguyễn Liên Chi, Nguyễn Hữu Hồ, Nguyễn Văn Uyển (1989), "Chuyển gen kháng kanamycin vào mô thuốc lá (*N. tabacum*) và mô lá cây cà úc bằng vi khuẩn *A. tumefaciens*", *Tạp chí Di truyền*, **1**, tr.43-48.
- [14] Bùi Văn Thắng, Lê Văn Sơn, Chu Hoàng Hà (2013), "Nghiên cứu tạo cây thuốc lá (*Nicotiana tabacum* L.) chuyển gen *codA* mã hóa choline oxidase tăng cường khả năng chịu mặn", *Hội nghị khoa học công nghệ sinh học toàn quốc*, tr.1059-1063.
- [15] Hà Hồng Hạnh, Lê Thanh Hương, Lê Thị Thu Hiền (2013), "Phân lập gen mã hóa chitinase và thiết kế các vector biểu hiện thực vật", *Hội nghị khoa học công nghệ sinh học toàn quốc*, tr.82-86.
- [16] A. Sharma, et al. (2016), "Ectopic Expression of an Atypical Hydrophobic Group 5 LEA Protein from Wild Peanut, *Arachis diogeni* Confers Abiotic Stress Tolerance in Tobacco", *PLOS ONE*, **11**, e0150609.
- [17] M. Wang, et al. (2014), "SiLEA14, a novel atypical LEA protein, confers abiotic stress resistance in foxtail millet", *BMC Plant Biology*, **14**, pp.290-305.