

Chọn tạo các dòng ngô được chuyển gen kháng sâu (*CryIAc*) thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*

Trương Thu Hằng*

Trường Cao đẳng Sư phạm Thái Nguyên
Đường Quang Trung, Phường Thịnh Đán, TP Thái Nguyên

Nhận ngày 09 tháng 10 năm 2012

Chỉnh sửa ngày 24 tháng 10 năm 2013; chấp nhận đăng ngày 10 tháng 10 năm 2013

Tóm tắt. Ngô (*Zea Mays L.*) là một trong 3 cây ngũ cốc quan trọng (lúa mì, lúa nước, ngô) của thế giới. Phương pháp biến nạp gen thông qua vi khuẩn đất *Agrobacterium tumefaciens* với ưu điểm là ít tốn kém, dễ áp dụng trên các đối tượng cây trồng nên phương pháp này rất phù hợp với điều kiện của các nước đang phát triển như Việt Nam.

1. Đã chuyển thành công gen kháng sâu *CryIAc* thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* vào dòng ngô HR9 nhập nội.

2. Đã bước đầu đánh giá sự biểu hiện của gen biến nạp bằng phương pháp PCR và phương pháp đánh giá cây chuyển gen được trồng trong nhà lưới cách li côn trùng.

Các kết quả nghiên cứu có giá trị khoa học và có ý nghĩa thực tiễn trong phát triển các giống cây ngô chuyển gen ở Việt Nam trong tương lai.

1. Mở đầu

Ngô (*Zea Mays L.*) là một trong 3 cây ngũ cốc quan trọng (lúa mì, lúa nước, ngô) của thế giới. Tính đến năm 2008 diện tích trồng ngô thế giới vào khoảng 157, 51 triệu ha, năng suất 4,96 tấn/ha, sản lượng khoảng 782,96 triệu tấn [1].

Ở nước ta, ngô là cây lương thực quan trọng thứ 2 sau cây lúa và là cây màu quan trọng nhất. Năm 2008, diện tích trồng ngô đạt 1,1 triệu ha, năng suất khoảng 4 tấn/ ha, sản lượng là 4,53 triệu tấn [2].

Đánh giá sự phát triển ngô thế giới có 4 nguyên nhân thúc đẩy tăng năng suất và sản lượng đã được chỉ ra là: i) thay đổi cơ bản về giống (thụ phấn tự do, lai kép, lai đơn); ii) tăng khả năng chống chịu; iii) áp dụng các tiến bộ kỹ thuật và iv) tăng năng suất dòng bố mẹ [1]

Một trong 4 nguyên nhân thúc đẩy sự phát triển ngô thế giới đó là tăng cường khả năng chống chịu của giống. Khả năng chống chịu của giống bao gồm chống lại các tác nhân sinh học (Biotic stresses) và phi sinh học (Abiotic stresses). Các tác nhân phi sinh học bao gồm hạn, lạnh, nóng, muối cao, axit....Theo thống kê của Dean & Adang [3], Oerke & CS [4] những tổn thất mùa màng nghiêm trọng trên

* ĐT: 84-1276390580.

E-mail: hanganh10@gmail.com

toàn cầu là do sâu bệnh gây ra ước tính chiếm từ 35 đến 42% tổng sản lượng lương thực hàng năm, trong đó thiệt hại do côn trùng chiếm từ 13 – 16%. Mức độ thiệt hại có khi lên tới 70% nếu như cây trồng không được áp dụng các biện pháp bảo vệ. Với cây ngô, sâu đục thân ngô (miền Nam gọi là bắp) chúng có tên khoa học là *Ostrinia nubilalis* thuộc họ Ngài sáng (*Pyralidae*), Bộ cánh vẩy (*Lepidoptera*) và sâu xám (*Agrotis ypsilon*) thuộc họ ngài đêm (*Noctuidae*), Bộ cánh vẩy (*Lepidoptera*) là hai loại sâu hại rất phổ biến trên ngô, thường gây hại rất nặng đối với cây bắp ở nhiều vùng trồng bắp của nước ta. Ở nước ta, sâu đục thân ngô thường gây hại nặng ở nhiều vùng và trong mọi mùa vụ. Ở khu vực Đồng bằng sông Cửu Long, sâu phá hại ngô thường tập trung vào các tháng mùa mưa do độ ẩm cao. Ruộng ngô bị sâu đục thân nặng làm số cây bị hại có khi lên đến 80-90%, dẫn đến năng suất bị giảm sút. Sâu xám là loại sâu hại nguy hiểm đối với ngô và hoa màu gieo trồng trong vụ đông xuân ở miền Bắc nước ta. Hàng năm, sâu phát sinh trên diện tích rộng lớn và gây thiệt hại rất lớn.

Hiện nay, rất nhiều loại thuốc trừ sâu hóa học đang được sử dụng để phòng trừ sâu bệnh với chi phí tốn kém, gây ô nhiễm môi trường và gây độc hại cho sức khỏe con người, vật nuôi. Để cải thiện tình hình này, chúng ta cần sử dụng những kỹ thuật tiên tiến trong bảo vệ cây trồng nhằm xây dựng một nền nông nghiệp sạch, bền vững. Việc tạo ra các giống cây trồng biến đổi di truyền (Genetically Modified Crops, GMOs) có khả năng kháng sâu bệnh và côn trùng nhờ kỹ thuật tạo dòng phân tử, kỹ thuật chuyển gen thực vật đang được quan tâm nghiên cứu và ứng dụng vào thực tiễn nhằm nâng cao năng suất cây trồng và đem lại lợi ích tối đa cho nền nông nghiệp. Đến nay hàng loạt

gen mã hóa protein có hoạt tính diệt côn trùng gây hại (gen kháng côn trùng) như gen cry của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*, gen mã hóa các chất ức chế proteaza và α - amylaza... được chuyển vào thực vật nhờ các phương pháp thích hợp với sản phẩm là những cây trồng có khả năng tự kháng sâu bệnh.

Trên thế giới, khá nhiều phương pháp chuyển gen thực vật đã được nghiên cứu và áp dụng thành công, như phương pháp vi tiêm, sử dụng súng bắn gen, xung điện. Trong đó, phương pháp có giá trị thực tiễn cao và được sử dụng rộng rãi nhất là phương pháp biến nạp gen thông qua vi khuẩn đất *Agrobacterium tumefaciens*. Với ưu điểm là ít tốn kém, dễ áp dụng trên các đối tượng cây trồng nên phương pháp này rất phù hợp với điều kiện của các nước đang phát triển như Việt Nam [5].

2. Vật liệu

2.1. Vật liệu thực vật

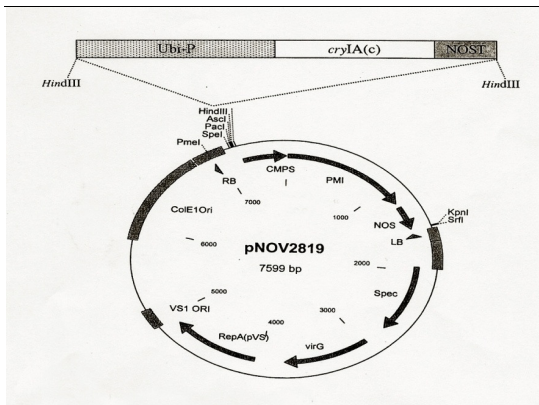
Vật liệu sử dụng trong các thí nghiệm là hai dòng ngô nhập nội: HR8, HR9. Các cây ngô mẹ cho bắp thí nghiệm được trồng trong nhà lưới.

2.2. Chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* và vector biến nạp

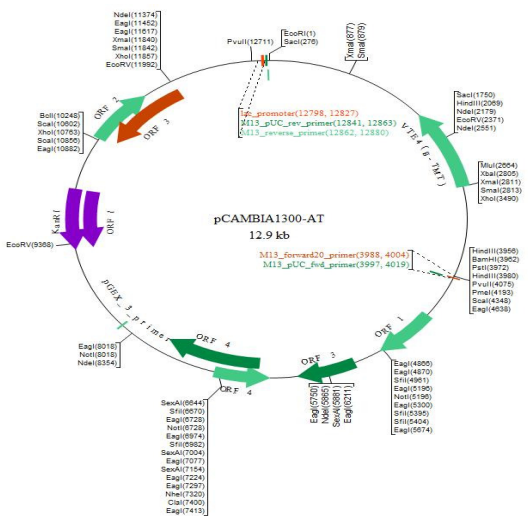
Chúng tôi sử dụng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* chủng LBA4404 mang ADN plasmid vector là Padt1 chứa gen kháng sâu *CryIAC* được điều khiển bởi đoạn khởi động Ubiquitin và gen chọn lọc thực vật là *hyg* (H) và Padt2 chứa gen kháng sâu *CryIAC* được điều khiển bởi đoạn khởi động Ubiquitin và gen chọn lọc thực vật là *pmi* (M) bảng 1.

Bảng 1 Thông tin liên quan đến hệ thống biến nạp H và M

Plasmid vector	Padt1	Padt2
Vector gốc	Pcambia 1300	Pnov2819
Kết cấu gen quan tâm	Ubiquitin + <i>CryIAc</i> + NOS	Ubiquitin + <i>CryIAc</i> + NOS
Chỉ thị chọn lọc trong <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Kanamycin (50µg/ml)	Spectomicin (50µg/ml)
Chỉ thị chọn lọc trong thực vật	Hygromycin (15-50µg/ml)	Mannose (10-15g/l)
Hệ thống biến nạp	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404: Padt1 (H)	<i>Agrobacterium tumefaciens</i> LBA4404: Padt2 (M)



Hình 1 Cấu trúc vector pNOV2819.



Hình 2. Cấu trúc vector Pcambia 1300.

3. Phương pháp nghiên cứu

3.1. Biến nạp gen thông qua *Agrobacterium tumefaciens*

3.1.1. Tạo dịch huyền phù *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens chủng LB4404 chứa plasmid quan tâm được cất giữ trong glycerol ở -20°C. Cây trải vi khuẩn trên lên đĩa môi trường LB đặc có bổ sung kháng sinh tương ứng, nuôi ở 21°C trong 2-3 ngày.

Cấy khuẩn lạc vi khuẩn nuôi trong môi trường LB đặc trên sang môi trường LB lỏng có bổ sung kháng sinh thích hợp và lắc ở 150 vòng/phút, 25°C, tiến hành nuôi qua đêm.

Sau 8-12 giờ lấy dịch huyền phù vi khuẩn nuôi cấy trên ly tâm với tốc độ 5000 vòng/phút, ở 4°C trong 5 phút. Loại bỏ dịch nổi và hoà tan cặn vi khuẩn bằng dịch nuôi hoặc bằng LB lỏng mới. Pha loãng dịch khuẩn cho tới khi đạt được OD₆₀₀ ≈ 0.5-1.0.

Thu được dịch huyền phù vi khuẩn này được sử dụng để lây nhiễm ngay với phiên non.

3.1.2. Lây nhiễm vi khuẩn với phiên

Bấp non được thu từ các cây ngô mẹ trồng trong nhà lưới. Ngay sau khi thu, phiên non được tách trong điều kiện vô trùng. Phiên non sau đó

được đưa vào môi trường IM có bổ sung AS và dịch huyền phù vi khuẩn trong 30-60 phút, lắc nhẹ ở nhiệt độ 21⁰C, trong điều kiện tối.

- *Đồng nuôi cấy*

Phôi sau khi lây nhiễm với vi khuẩn được chuyển sang môi trường nuôi cộng sinh CCM, nuôi trong tối, ở nhiệt độ 21⁰C trong 4 ngày.

- *Nuôi phục hồi*

Chuyển phôi đã biến nạp từ môi trường CCM sang môi trường ReM, nuôi trong tối ở 25⁰C trong 7 ngày.

- *Chọn lọc mô sẹo chuyển gen*

Mô sẹo tạo thành từ phôi non đã biến nạp trên môi trường ReM được cấy chuyển sang môi trường ReM mới có bổ sung kháng sinh chọn lọc thực vật tương ứng, nuôi trong tối ở 25⁰C, thời gian 20 ngày.

- *Tạo chồi*

Mô sẹo phôi hoá tạo thành trên môi trường chọn lọc ReM được cấy chuyển sang môi trường ReM mới có bổ sung kháng sinh chọn lọc thực vật thích hợp để tái sinh chồi, nuôi sáng ở 25⁰C, thời gian 20 ngày.

- *Tái sinh cây biến nạp gen hoàn chỉnh*

Chồi tái sinh trong môi trường chọn lọc SeM được cấy chuyển sang môi trường tạo cây hoàn chỉnh RM có bổ sung kháng sinh chọn lọc thực vật, nuôi sáng ở 25⁰C, thời gian 10-20 ngày.

A. *Chuyển cây ra đất:*

Cây tái sinh trên môi trường chọn lọc RM có 2-3 lá, 3-4 rễ được chuyển ra đất trồng.

Môi trường sử dụng trong các bước chuyển gen được thể hiện ở bảng 2

Bảng 2. Môi trường sử dụng trong biến nạp gen nhờ *Agrobacterium tumefaciens*

Thành phần	IMAS	CCM	ReM	SeM	RM
N6	+	+	+	+	-
MS	-	-	-	-	+
Sucrose g/l	30	30	30	30	60
Glucose g/l	60	-	-	-	-
L-proline (g/l)	-	0.7	0.7	0.7	-
MES (g/l)	-	-	0.5-1,5	0.5-1,5	-
Hygromycin (mg/l)	-	-	15-50	15-50	15 -50
2,4-D (mg/l)	-	2.5	2.5	-	-
Ph	5.2	5.8	5.8	5.8	5.8
Phytigel (g/l)	-	5	5	5	5
AgNO ₃ (1mg/ml)	-	0.5	0.5	0.5	-
AS (Mm)	100	100	-	-	-
Cefotaxime (mg/ml)	-	-	150	150	150
Myo-inositol (g/l)	-	-	-	-	1

Bảng 3. Môi trường sử dụng chỉ thị manose trong biến nạp gen nhờ *Agrobacterium tumefaciens*

Thành phần	IMAS	CCM	ReM	SeM	RM
N6	+	+	+	+	-
MS	-	-	-	-	+
Sucrose g/l	30	30	30	30	60
Glucose g/l	60	-	-	-	-

L-proline (g/l)	-	0.7	0.7	0.7	-
MES (g/l)	-	-	0.5-1,5	0.5-1,5	-
Hygromycin (mg/l)	-	-	-	-	-
2,4-D (mg/l)	-	2.5	2.5	-	-
Ph	5.2	5.8	5.8	5.8	5.8
Phytigel (g/l)	-	5	5	5	5
AgNO ₃ (1mg/ml)	-	0.5	0.5	0.5	-
AS (Mm)	100	100	-	-	-
Cefotaxime (mg/ml)	-	-	150	150	150
Myo-inositol (g/l)	-	-	-	-	1

3.2. Phân tích cây được biến nạp gen

3.2.1. Phương pháp tách chiết ADN tổng số từ mô lá ngô

Các cây tái sinh được đưa ra đất. Khi cây có lá thứ 4 thì tiến hành thu mẫu lá để tách chiết ADN. ADN được tách chiết và tinh sạch bằng phương pháp CTAB của Saghai Maroof (1984) [6] có cải tiến cho phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm.

Hóa chất được sử dụng để tách chiết ADN như sau:

- A. Đệm CTAB 100 ml gồm:
 - + CTAB (Cetyltrimethyl ammonium bromide): 2,25 gam
 - + β -Mercapto ethanol : 250 μ l
- + EDTA (Ethylenediamine tetraacetate): 4,5 ml
- + NaCl 5 M : 30 ml
- + Tris HCl 8,0: 15 ml
- + H₂O: 55 ml
- A. Đệm TE EDTA Ph 8,0 gồm:
 - + Tris HCl 8,0: 10 Mm
 - + EDTA 8,0:1 Mm
 - Enzym Rnase: 10 μ g/ml
 - Cồn tuyệt đối lạnh

- NaCl 5 M

- Dung dịch (24:1) gồm Chloroform/Isoamylalcohol pha theo tỷ lệ 24/1.

- Isopropanol.

- Dung dịch rửa là cồn 75%.

Tách chiết ADN từ lá ngô:

Bước 1: Nghiền 0,3- 0,5 gam lá ngô trong nitor lỏng thành bột mịn.

Bước 2: Chuyển bột lá vào ống ly tâm 1,5 ml. Thêm 0,8 ml đệm CTAB đã ủ ở 65⁰ C trong 10 phút.

Bước 3: ủ các ống ly tâm ở 65⁰ C trong 90 phút, lắc nhẹ nhàng nhưng dứt khoát 20 phút một lần để việc tách có hiệu quả.

Bước 4: Ly tâm 12.000 vòng/phút, hút lớn dịch nổi sang ống mới rồi bổ sung 0.7ml dung dịch 24:1, lắc nhẹ nhàng trong 10 phút rồi tiến hành ly tâm trong 10 phút ở tốc độ 10.000 vòng/phút ở nhiệt độ phòng.

Bước 5: Hút lớp dịch nổi sang ống mới rồi bổ sung 10 μ l ARNase (nồng độ 1 μ g/ μ l), ủ trong 1 đến 2 tiếng ở nhiệt độ 37⁰C,

Bước 6. Bổ sung 0.6ml dung dịch 24:1, lắc nhẹ trong 10 phút. Rồi tiến hành ly tâm trong tốc độ 10.000 vòng/phút trong 10 phút.

Bước 7: Hút lớp trên sang ống mới, sử dụng iso propanol lạnh (0.6 ml – 0.8 ml) và 10 μ l NaCl 5 M để kết tủa ADN trong ống.

Bước 8: Ly tâm 7 phút tốc độ 10.000 vòng/phút ở nhiệt độ phòng để thu kết tủa ADN. Thêm 1 ml dung dịch rửa (cồn 75 %), lắc trong vài phút, ly tâm trong 7 phút ở tốc độ 10.000 vòng/phút. Lặp lại việc rửa bằng cồn từ 1 đến 2 lần tùy theo mẫu ADN thu được. Thổi khô ADN hoặc để khô tự nhiên.

Bước 9: Hòa tan ADN kết tủa bằng dung dịch TE 8,0. Bảo quản ADN ở 4⁰ C. ADN sau khi tinh sạch theo phương pháp trên được đo nồng độ nhờ máy quang phổ Nanodrop và dựa vào đó để pha loãng ADN ra nồng độ 50 ng/ μ l bằng nước cất khử ion để chuẩn bị cho các nghiên cứu tiếp theo.

3.2.2. Phân tích PCR các cây biến nạp gen

Nguyên tắc của PCR dựa vào sự phối hợp khả năng lai đặc hiệu của ADN và khả năng tổng hợp ADN *in vitro* của ADN polymerase để nhân bản *in vitro* các đoạn ADN (gen) khác nhau lên hàng triệu lần so với ban đầu. ADN polymerase hoạt động theo nguyên tắc cần phức hợp khuôn mẫu, trong môi trường thích hợp có các Dntp thì sẽ kéo dài thành sợi bổ sung với sợi khuôn. Vì vậy để nhân bản được đoạn ADN đích, người ta cần phải biết được trình tự nucleotide ở hai đầu đoạn ADN cần nhân bản để từ đó thiết kế cặp mồi đặc hiệu. Mồi dùng trong phản ứng PCR thường có chiều dài từ 10 đến 40 nucleotide, tùy thuộc vào mức độ khuếch đại đặc hiệu đối với trình tự đích và tùy thuộc vào mục đích của các nhà nghiên cứu. Sau khi tiến hành chạy PCR với các mẫu phân tích, sự sai khác của ADN được kiểm tra dựa vào phương pháp điện di.

Chúng tôi sử dụng hai cặp mồi là *pmi* xác định sự có mặt của gen kháng manose (chị thị của thực vật) và cặp mồi *CryIAC* xác định sự có mặt của gen kháng sâu *CryIAC*.

Hỗn hợp phản ứng bao gồm:

- H ₂ O	13,5 μ l
- Dung dịch đệm 10X _{pcr}	2,0 μ l
- MgCl (50 Mm)	1,0 μ l
- Dntp (1 Mm)	2,5 μ l
- Mồi xuôi (50 ng/ μ l)	0,5 μ l
- Mồi ngược (50 ng/ μ l)	0,5 μ l
- Tag- polymerase (5UI/ μ l)	0,5 μ l
- ADN (25 ng/ μ l)	1 μ l

Phản ứng chạy trên máy PCR PTC-100 (MJ Research Inc, USA).

Chương trình chạy với cặp mồi PMI như sau:

- 94 ⁰ C trong 3 phút	} 35 chu kỳ
- 94 ⁰ C trong 1 phút	
- 59 ⁰ C trong 30 giây	
- 72 ⁰ C trong 1 phút 30 giây	
- 72 ⁰ C trong 10 phút	
- 4 ⁰ C	

Chương trình chạy với cặp mồi Cry như sau:

- 94 ⁰ C trong 3 phút	} 35 chu kỳ
- 94 ⁰ C trong 1 phút	
- 55 ⁰ C trong 45 giây	
- 72 ⁰ C trong 1 phút	
- 72 ⁰ C trong 10 phút	
- 4 ⁰ C	

Sản phẩm PCR sau đó được điện di trên gel agarose nồng độ 1%.

Chuẩn bị bản gel:

- Chuẩn bị khay điện di, lau khô, cài lược, chỉnh cho cân bằng.

- Chuẩn bị gel agarose 1%, đưa vào lò vi sóng khoảng 2 phút cho agarose tan hoàn toàn trong dung dịch 1X_{tbe}. Để nguội khi hỗn hợp còn 50-60⁰C, bổ sung ethidium bromide rồi đổ vào khay điện di.

- Sau khoảng 45-60 phút gel đông lại. Rút lược khỏi bản gel. Đặt khay vào bể điện di, bổ sung thêm dung dịch 1X_{tbe} cho ngập mặt gel,

Tra mẫu ADN:

- Lấy 2 μ l đệm tra mẫu, thêm vào 8 μ l ADN sản phẩm, trộn đều rồi tra vào các giếng. Tra thêm ADN marker 1 kb vào giếng đầu tiên để xác định độ dài của các băng ADN.

- Lắp nguồn điện vào bể điện di, chỉnh điện thế từ 85V-100V trong khoảng 45 phút đến 1 giờ. ADN sẽ di chuyển từ cực âm sang cực dương của điện trường. Dựa vào vị trí của vạch màu để dừng quá trình điện di.

Nhuộm bản gel và chụp ảnh

- Gel được soi dưới ánh sáng tử ngoại ở bước sóng 245 nm-260 nm của máy soi và chụp ảnh bản gel bằng máy CLS-Microdoc (Clever Scientific Ltd.)

3.2.3. Phương pháp đánh giá tính kháng sâu trong điều kiện nhà lưới

Các dòng ngô tái sinh khi được 2-3 lá được chuyển ra đất trồng. Khi cây được 5-6 lá, sâu đục thân tuổi 1 đến tuổi 2 do Viện Bảo vệ Thực vật cung cấp được thả vào nống cây ngô chuyển gen và đối chứng. Sau khi thả sâu tiến hành quan sát và theo dõi mức độ kháng sâu của các cây chuyển gen và đối chứng qua các thông số sau: số lá bị sâu đục thân cắn, số lỗ bị đục ở lá trên cùng, kích thước lỗ bị đục, sâu bị chết trên lá. Trong quá trình thu hoạch kiểm tra sự sinh trưởng phát triển của sâu trên bắp và đặc biệt là trong thân ngô.

4. Kết quả

4.1. Khả năng biến nạp gen kháng sâu (CryIAc) vào dòng ngô HR8, HR9 vụ đông xuân 2007-2008

Trong biến nạp gen thực vật, đặc biệt là biến nạp gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium* thì khả năng sống sót và mức độ tái sinh cây hoàn chỉnh của mẫu biến nạp sau khi trải qua các giai đoạn nuôi cấy chọn lọc là hết sức quan trọng, quyết định đến hiệu quả quá trình biến nạp.

Trong thí nghiệm của chúng tôi, phôi non của hai dòng ngô này được sử dụng làm vật liệu trong hai hệ thống biến nạp khác biệt nhau (H) và (M). Hệ thống biến nạp (H) là vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* chủng LBA4404 mang AND plasmid vector – Padt1 chứa gen kháng sâu (CryIAc) và chỉ thị chọn lọc trong thực vật là hygromycin. Ngược lại, hệ thống biến nạp (M) là vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* chủng LBA4404 mang AND plasmid vector – Padt2 chứa gen kháng sâu (CryIAc) và chỉ thị chọn lọc trong thực vật là manose. Kết quả thí nghiệm được thể hiện trong bảng 4.

Bảng 4. Kết quả biến nạp của hai dòng ngô chuyển gen trong vụ đông xuân 2007-2008

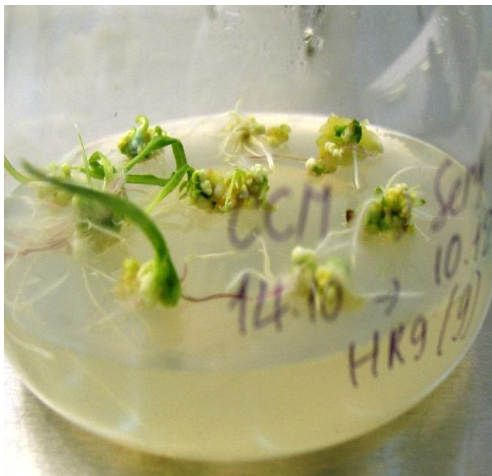
STT	Dòng	Chủng biến nạp	Số lượng mẫu			TL tạo mô sẹo	TL tái sinh chồi	Cây ra bầu	Cây ra ruộng	Cây kết hạt
			CCM	ReM	SeM					
1		H	420	125	0	21%	0	0	0	0
2	HR8	M	159	33	25	31%	0	0	0	0
3		H	230	77	0	47%	0	0	0	0
4	HR9	M	1458	500	207	76%	3%	18	1	0

Qua bảng 4 ta thấy khả năng tiếp nhận gen *CryIAc* của dòng HR9 tốt hơn dòng HR8. Tỷ lệ tạo mô sẹo, tỷ lệ tái sinh cây và số cây ra bầu khi sử dụng hệ thống biến nạp (M) cao hơn khi sử dụng hệ thống biến nạp (H) ở cả hai dòng HR8 và HR9.

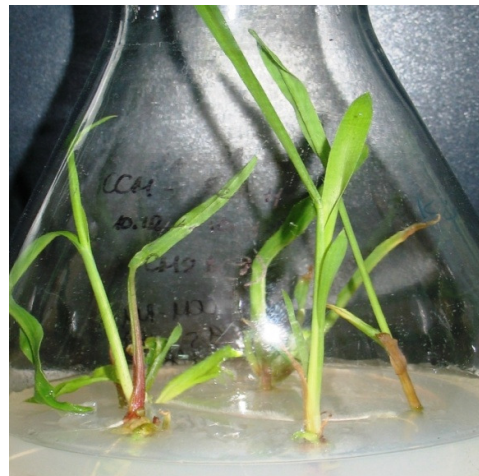
Để phân biệt được các tế bào chuyển gen với các tế bào không chuyển gen, trong quá trình chuyển nạp người ta thường đưa vào cùng một lúc với gen hữu dụng là các gen mã hoá chất kháng sinh trong cùng một T-ADN. Do đó chỉ các tế bào chuyển gen mới phát triển được trên môi trường nuôi cấy có chất kháng sinh. Các gen kháng sinh này sẽ cùng tồn tại trong cây chuyển gen cùng với gen hữu dụng. Tuy nhiên việc biểu hiện của các độc tố kháng sinh trong cây chuyển gen và sản phẩm của chúng là một hạn chế rất lớn về an toàn sinh học, làm chậm tiến độ ứng dụng cây chuyển gen trong sản xuất nông nghiệp. Để khắc phục nhược điểm này, một hệ thống chọn lọc tích cực bằng đường mannose đã được sử dụng. Hệ thống chọn lọc bằng mannose dựa trên việc sử dụng gen *pmi* – được phân lập từ *Escherichia coli* – làm gen chỉ thị để điều khiển tạo ra enzyme

phosphomannose isomerase. Trong môi trường nuôi cấy có thêm mannose, tế bào đối chứng không mang gen *pmi*, enzyme hexokinase trong các tế bào làm biến đổi mannose thành mannose 6-phosphate là nguồn carbon mà tế bào cây không sử dụng nên không phát triển được. Tế bào có mang gen *pmi*, enzyme phosphomannose isomerase được tạo thành làm chuyển hoá mannose-6-phosphate thành fructose-6-phosphate là nguồn carbon mà tế bào cây có thể sử dụng được cho sự sinh trưởng và phát triển. Vì vậy, chỉ có cây trồng có mang gen *pmi* mới có khả năng phát triển bình thường trong môi trường nuôi cấy có chứa mannose, trong khi các tế bào không có gen *pmi* không phát triển được. Hệ thống chọn lọc bằng mannose đã được áp dụng trong tạo cây biến đổi gen ở củ cải đường [7], ngô, lúa mì [8] và lúa indica.

Trong thí nghiệm của chúng tôi, đường mannose không chỉ được sử dụng như là một chỉ thị chọn lọc thực vật mà còn là một nguồn cung cấp chất dinh dưỡng nhằm chọn tạo các dòng ngô biến đổi gen có tính an toàn sinh học cao (hình 3).



A. Sự phôi hóa của mô sẹo.



B. Cây tái sinh trong bình tam giác.

Hình 3. Một số hình ảnh tạo chồi và tái sinh của các dòng ngô trong vụ đông xuân 2007-2008.

4.2. Khả năng biến nạp gen kháng sâu (*CryIAc*) vào dòng ngô HR9 vụ hè thu 2007-2008

Từ kết quả biến nạp trong vụ đông xuân 2007-2008, chúng tôi quyết định chỉ sử dụng hệ thống biến nạp (M) và dòng ngô HR9 làm vật liệu nghiên cứu tiếp theo.

Với gần 5000 phôi của dòng HR9 (trong 20 lần thí nghiệm) được sử dụng làm vật liệu biến nạp trong vụ hè thu 2007-2008. Kết quả được trình bày tóm tắt trong bảng 5

Bảng 5. Kết quả biến nạp gen vào dòng HR9 trong vụ hè thu

Vụ	Dòng	Số lượng mẫu				TL tạo mô sẹo	TL tái sinh chồi	Cây ra bầu	Cây ra ruộng	Cây kết hạt
		CCM	ReM	SeM	RM					
Vụ đông xuân (đối chứng)	HR9	1458	4305	207	244	76%	3%	18	1	0
Vụ hè thu	HR9	4446	4305	1129	244	79%	33%	250	114	68

Qua bảng 5 chúng tôi nhận thấy tỉ lệ tạo mô sẹo, tỉ lệ tái sinh chồi, số cây ra bầu và số cây đưa ra đất thành công trong vụ hè thu tốt hơn so với vụ đông xuân 2007-2008.

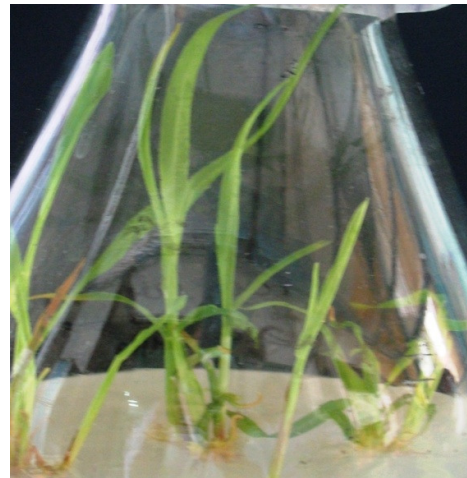
Cây ngô là một trong những cây chịu ảnh hưởng với các yếu tố môi trường (nhiệt độ, ánh sáng, độ ẩm...). Sự sinh trưởng phát triển của chúng trong các thời vụ khác nhau trong năm sẽ ảnh hưởng rất lớn đến chất lượng phôi non. Do vậy sẽ ảnh hưởng tới khả năng tiếp nhận gen lạ và mức độ hình thành mô sẹo phôi hóa, cũng như tỉ lệ tái sinh cây hoàn chỉnh.

Hơn thế nữa mùa vụ cũng ảnh hưởng đến tỷ lệ nhiễm trong quá trình biến nạp, ảnh hưởng đến khả năng sống sót khi đưa ra đất, ảnh hưởng đến sự sinh trưởng phát triển của cây ngô sau khi đưa ra đất và ảnh hưởng đến khả năng ra hoa kết hạt của cây sau khi đưa ra đất.

Như vậy, ngoài yếu tố kiểu gen (dòng HR9), cấu trúc vector và hệ thống chọn lọc thực vật thì yếu tố thời vụ (nhiệt độ, ánh sáng, độ ẩm...) cũng ảnh hưởng đến hiệu quả của quá trình biến nạp gen *CryIAc* vào dòng ngô HR9 (hình 4).



A. Sự phôi hóa của mô sẹo



B. Cây tái sinh trong bình tam giác



C. Hình ảnh tái sinh trong bình tam giác

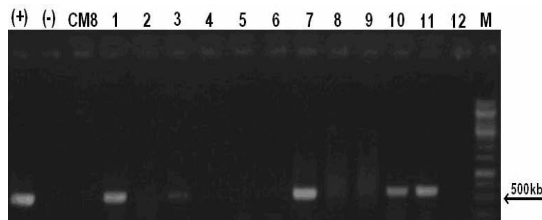


D. Cây tái sinh được đưa ra đất trước khi đưa ra môi trường tự nhiên

Hình 4. Một số hình ảnh trong quá trình biến nạp và tái sinh dòng ngô HR9.

4.3. Phân tích cây biến nạp gen ở thế hệ to

Trong số 114 cây đưa ra đất thành công trong vụ hè thu, chúng tôi thu được 68 cây có hạt. Để kiểm tra sự có mặt của gen *CryIAC* và gen chọn lọc *pmi* trong 68 dòng ngô này, ADN tổng số của chúng được sử dụng trong thí nghiệm phân tích PCR. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1%. Kết quả được trình bày ở hình 5 và bảng 6.



Hình 5. Kết quả phân tích PCR một số dòng ngô HR9 ở thế hệ To (M:1kb ADN ladder ready-to-use # SM1163; +: vector pADT2; (-):H₂O; CM8: dòng ngô không biến nạp gen (làm đối chứng); 1,3,7,10,11:dòng ngô biến nạp mang gen *CryIAC*;2,4,5,6, 8,9,12: dòng ngô không mang gen *CryIAC*).

Bảng 6. Kết quả phân tích PCR thế hệ To của vụ hè thu

STT	Dòng	Cây thu được hạt	Kết quả phân tích PCR	
			<i>pmi</i>	<i>CryIAC</i>
1	HR9	68	16	10

Qua bảng 6 chúng tôi nhận thấy trong số 68 cây dòng HR9 thu được hạt có 10 cây To có chứa gen *CryIAC*. Như vậy hiệu suất biến nạp gen *CryIAC* vào dòng HR9 khi sử dụng hệ thống biến nạp (M) đạt 0,22% (10/4446).

Trong thí nghiệm của chúng tôi với 4446 phôi non ngô được biến nạp với hệ thống biến nạp (M) đã thu được 16 cây mang gen *pmi* và 10 cây mang gen *CryIAC*. Hiệu suất của quá trình biến nạp này sẽ được cải thiện đáng kể nếu tỉ lệ nhiễm trong quá trình biến nạp (lúc nuôi cấy phục hồi, khi đồng nuôi cấy, khi nuôi cấy chọn lọc và khi tái sinh cây hoàn chỉnh...) được giảm thiểu tối đa, đồng thời nâng cao tỉ lệ sống sót và tỉ lệ kết hạt khi đưa cây ra đất.

3.4. Sự biểu hiện của gen kháng sâu (*CryIAC*) ở thể hệ T1

Trong các nghiên cứu chuyển gen nhờ *Agrobacterium tumefaciens*, loài vi khuẩn này thường tồn tại lâu dài trong mô tế bào thực vật mặc dù đã trải qua quá trình loại bỏ vi khuẩn và chọn lọc tế bào thực vật chuyển gen. Và với nhiều loại đối tượng thì (i): vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* mang gen chuyển còn tồn tại trong khối mô hay trong gian bào của mẫu phân tích; (ii) gen chuyển tồn tại tự do trong tế bào chất, có thể biến mất qua sinh sản hữu tính; (iii) gen chuyển tồn tại không hoạt động, tức là không biểu hiện thành protein có chức năng sinh học. Hiện tượng này thường thấy ở nhiều loại đối tượng. Tuy nhiên nếu là mẫu phân tích của thực vật đã qua nhân giống hữu tính, tức là qua thể hệ T1, T2 ... dưới dạng hạt thì hoàn toàn loại trừ khả năng này. Do đó để khẳng định sự biểu hiện của gen (*CryIAC*) về kiểu gen và kiểu hình ở thể hệ T1, hơn 1500 hạt của 10 dòng thể hệ To có chứa gen kháng sâu (*CryIAC*) được trồng trong nhà lưới cách li (Hình 6). Khi cây được 5-6 lá chúng tôi tiến hành thu mẫu lá để lưu giữ trong tủ lạnh sâu -80°C, sau đó tiến hành thả sâu đục thân từ tuổi 1-2 với 3 lần lặp lại để đạt mật độ 9-10 con/cây. Kết quả thí nghiệm đã chỉ ra rằng trong số hơn 1500 cá thể thuộc 10 dòng HR9 thể hệ To mang gen *CryIAC* có khoảng hơn 100 cá thể thuộc 10 dòng To nói trên có biểu hiện kháng sâu đục thân cao (Hình 7). Để kiểm tra sự có mặt của gen *CryIAC* trong hơn 100 cá thể T1 trên, ADN tổng số của chúng đã được tách chiết và sử dụng trong thí nghiệm phân tích PCR. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1%. Kết quả được trình bày ở hình 8.

Trong biến nạp gen nói chung và biến nạp gen thực vật nói riêng, việc tạo ra các cá thể mang gen quan tâm là yếu tố cần có, song sự biểu hiện của gen này trong cá thể mang chúng mới là yếu tố quan trọng hơn cả quyết định đến hiệu quả của quá trình biến nạp. Thông thường, sự biểu hiện của gen quan tâm trong các cá thể được biến nạp gen phụ thuộc vào: cấu trúc vector: (đoạn khởi động, đoạn kết thúc...), số lượng bản sao đính vào hệ gen và cả vị trí mà các bản sao này định vị...

Trong thí nghiệm của chúng tôi gen *CryIAC* đã được xác định có mặt trong các cá thể T1 có biểu hiện kháng sâu đục thân. Do vậy có thể kết luận rằng gen *CryIAC* đã được biến nạp thành công vào dòng ngô HR9.

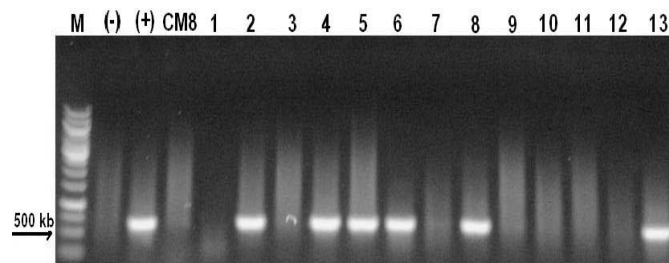
Để tạo ra các dòng ngô biến đổi gen, thông thường các tác giả trước đây phải biến nạp gen quan tâm vào các dòng ngô mô hình. Sau đó từ các dòng ngô mô hình đã mang gen quan tâm được lai chuyển sang các dòng ngô thương mại bằng phương pháp chọn giống truyền thống. Hơn thế nữa, để tạo các giống ngô thương mại, có năng suất cao, chống chịu tốt với điều kiện bất lợi, đồng thời phải có chất lượng tốt, trong đó màu sắc của hạt là một chỉ tiêu quan trọng. Trong thực tế các giống ngô màu vàng hoặc màu đỏ thì có giá trị thương mại cao. Trong chọn giống chỉ có giống bố mẹ có hạt màu vàng/ đỏ thì mới có khả năng tạo ra giống lai màu vàng/ màu đỏ. Các dòng ngô biến đổi gen HR9 lần đầu tiên được chúng tôi tạo ra tại Việt Nam có hạt màu vàng và không chứa các gen kháng sinh. Đây là vật liệu lý tưởng trong chương trình chọn tạo các giống ngô của Việt Nam có khả năng chống chịu với sâu bệnh và các điều kiện bất lợi, có khả năng thương mại hoá cao.



Hình 6. Hạt của 10 dòng ngô thể hệ To có chứa gen kháng sâu (*CryIAc*) được trồng trong nhà lưới cách li.



Hình 7. Các dòng ngô biến đổi gen ở thể hệ T1 có biểu hiện kháng sâu đục thân (Sâu chết trên lá a,b; sâu sống (đối chứng):c; sâu chết trong thân:d).



Hình 8. Kết quả phân tích PCR một số cá thể hệ T1 của các dòng ngô đã được biến nạp HR9 ở thể hệ To mang gen *CryIAc* (M:1kb ADN ladder ready-to-use # SM1163 +: vector pADT2;(-):H₂O; CM8: dòng ngô không biến nạp gen; 2,4,5,6,8,13: dòng ngô T1 có biểu hiện kháng sâu; 1,7,9,10,11,12: dòng ngô T1 không biểu hiện tính kháng sâu).

Tài liệu tham khảo

- [1] FAOSTAT (1986/ 2008), <http://faostat.fao.org/faostat/notes/citation.htm/online>
- [2] Tổng cục thống kê (2008), Niên giám thống kê, tr. 12-20.
- [3] Dean D. H., Adang M.J. (1992), “Protein engineering of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins and genetic manipulation for plant protection”, In: *Plant Protein Engineering*, Shewry P.R., Gutteridge S. (Eds.), Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 293-311.
- [4] Oerke E.C., Dehne H.W., Schonbeck F., Weber A. (1994), “Crop production and crop protection: Estimated losses in major food and cash crops”, Elsevier, Amsterdam
- [5] Lê Trần Bình, Phan Văn Chi, Nông Văn Hải, Trương Nam Hải, Lê Quang Huân, (2003), “Áp dụng các kỹ thuật phân tử trong nghiên cứu tài nguyên sinh vật Việt Nam”, Nhà Xuất bản Khoa học & Kỹ thuật, Hà Nội
- [6] Sagghai Maroof, M.A., Solima, K.M., Jorgenson, R.A., Allard, R.W. (1984), “Ribosome DNA spacer –length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics.” *Natl. Aca. Sci. USA* 81: 8014 - 8018
- [7] Joerbo M., Donaldson I., Kreiberg J., Peterson S.G., Brunstedt J. and Okkels F.T. (1998), “Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet”, *Molecular Breed* (4), pp. 111-117.
- [8] Wright M., Dawson J., Dunder E., Suttie J., Reed J., Kramer R., Chang Y.F., Novitzky R. Wang H. and Artim-Moor L. (2001), “Efficient biolistic transformation of maize (*Zea mays* L.) and wheat (*Triticum aestivum* L.) using the phosphomannose isomerase gene, pmi, as the selectable marker”, *Plant Cell Report* (20), pp. 429-436

Choosing and Creating Maize Lines Carrying Insect Resistant Gene (*CryIac*) by using *Agrobacterium Tumefaciens*

Trương Thu Hằng

Thái Nguyên teacher training College, Quang Trung road, Thịnh Dân quarter, Thái Nguyên city, Thái Nguyên province

Abstract: Maize, together with wheat and water rice, is one of the most important cereals of the world. Gene transformation via *Agrobacterium tumefaciens* has been popular among developing countries like Viet Nam for being cost – saving and easily applicable on various kinds of plants.

1. Insect resistant gene (*CryIac*) has been transferred successfully into HR9 imported maize lines.

2. The research has initially assessed the expression of the transgenic gene by PCR method and assessment method for transgenic plants grown in insect isolated grid house.

Findings and results of thesis are of scientific value and practically significant for developing transgenic corn trees in Viet Nam in future.