

Nghiên cứu tạo cây thuốc lá chuyển gen *ssiv* tăng cường sinh tổng hợp tinh bột thông qua *Agrobacterium tumefaciens*

Nguyễn Thị Minh Hồng^{1,2,*}, Lê Thu Ngọc¹, Nguyễn Khắc Hưng¹,
Nguyễn Thị Thơm¹, Phạm Bích Ngọc¹

¹*Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam*

²*Trường Đại Học Hồng Đức*

Nhận ngày 16 tháng 8 năm 2017

Chỉnh sửa ngày 09 tháng 9 năm 2017; Chấp nhận đăng ngày 10 tháng 10 năm 2017

Tóm tắt: Việc tăng năng suất tinh bột sử dụng công nghệ gen là một trong những hướng nghiên cứu quan trọng và luôn được các nhà khoa học quan tâm hàng đầu. Do vậy, các nghiên cứu tìm hiểu về con đường tổng hợp và phân hủy tinh bột ở cây trồng nói chung và đối với sản nói riêng sẽ góp phần thúc đẩy mục tiêu cải tạo năng suất tinh bột. Các starch synthase (SS) của thực vật bậc cao mã hóa bởi 5 nhóm gen ký hiệu là *GBSS* (granule-bound starch synthase), *SSI*, *SSII*, *SSIII*, và *SSVI*. Trong đó, mỗi biến thể enzyme SS có các cấu thành khác nhau và vai trò nhất định trong tổng hợp amylopectin. Ở nghiên cứu này chúng tôi đã phân lập được gen *ssiv* từ giống sản KM140. Cấu trúc này được chèn vào vector pK7WG2D-35S:SSIV:T35S và biến nạp vào cây thuốc lá bằng phương pháp chuyển gen thông qua *A. tumefaciens*. Sau đó, cây chuyển gen được kiểm tra bằng phương pháp PCR và đánh giá sự biểu hiện của gen qua phương pháp phân tích hàm lượng tinh bột. Kết quả cho thấy hàm lượng tinh bột tích lũy trong cây chuyển gen vượt trội hơn các cây không chuyển gen (26,9 - 67,9%; rễ 6,8 - 17,6%) ở cùng điều kiện sinh trưởng. Nghiên cứu này đã tạo ra một hướng mới trong việc tạo cây trồng biến đổi gen có khả năng tăng sự tích lũy tinh bột.

Từ khóa: Chuyển gen; tinh bột; sản; SS (starch synthase); *ssiv*.

1. Mở đầu

Tinh bột là nguồn carbohydrate chủ yếu cho con người và đồng thời là nguyên liệu quan trọng cho công nghiệp. Hiện nay, nguồn nguyên liệu tinh bột cho công nghiệp chủ yếu tách chiết từ ngô và một lượng đáng kể khác từ lúa, lúa mì, sắn, khoai tây, củ dong, cây cọ sagu,... Việc biến đổi quá trình trao đổi tinh bột trong cây trồng có thể góp phần tăng khả năng tích tụ tinh

bột trong các cơ quan dự trữ, ngăn chặn hoặc tăng việc phân hủy tinh bột (tùy thuộc vào loại cây trồng hay nhu cầu sử dụng) hoặc biến đổi cấu trúc tinh bột để tăng hoặc đa dạng chức năng của tinh bột trong thực phẩm và nguyên liệu của công nghiệp.

Tinh bột là một glucan không tan, được cấu thành từ hai chuỗi polymer bao gồm các tiểu phần là glucose, amylopectin và amylose. Ở thực vật bậc cao, tinh bột được tổng hợp trong plastid (thể lạp) của các tế bào quang hợp và không quang hợp. Là carbohydrate dự trữ chủ yếu, tinh bột đóng vai trò quan trọng trong suốt

*Tác giả liên hệ. ĐT.: 84-912603366.

Email: minh hong.hdu@gmail.com

<https://doi.org/10.25073/2588-1140/vnunst.4523>

chu kỳ sống của thực vật. Quá trình tổng hợp tinh bột α -1,4 glucan bao gồm ba bước quan trọng xảy ra trong lục lạp và thể vô sắc: i) cung cấp glucose-6-phosphate (Glc-6-P) vào trong các thể lạp, ii) tổng hợp ADP-glucose (ADPG) từ Glc-1-P, và iii) tổng hợp tinh bột từ ADPG [1, 10].

Việc tăng năng suất tinh bột sử dụng công nghệ gen là một trong những hướng nghiên cứu quan trọng và luôn được các nhà khoa học quan tâm hàng đầu. Trong các báo cáo gần đây, việc điều khiển sự biểu hiện của các gen *ss* đã được chứng minh có khả năng tăng sự tích lũy tinh bột. Các lớp gen này được cho là tương tác với nhau trong một phức hợp protein và đóng vai trò đặc biệt trong việc tổng hợp cấu trúc cuối cùng của hạt tinh bột [10]. Do đó, những thay đổi trong việc biểu hiện của 1 gen *ss* có thể dẫn tới các ảnh hưởng phức tạp. Điều này được minh chứng rõ nét qua các kết quả đã thu được trên khoai tây chuyển gen glycogen synthase có nguồn gốc từ vi khuẩn. Củ của các cây này tích lũy lượng tinh bột ít hơn với các đặc tính cấu trúc đã bị biến đổi [8].

Mặt khác, trong nhóm gen *SS* (*I - IV*) đã chứng minh được *SS* lớp *IV* (*ssiv*) có liên quan đến sự khởi đầu hình thành hạt tinh bột và có thể điều khiển số lượng hạt tinh bột trong lục lạp ở lá cây *Arabidopsis* [7]. Việc loại bỏ protein này dẫn đến sự giảm sút lượng tinh bột trong lá và toàn bộ tinh bột trong 1 lục lạp được tích lũy trong 1 hoặc 2 hạt tinh bột khổng lồ [6]. Mặt khác, khi nghiên cứu ảnh hưởng của việc biểu hiện quá mức gen *ssiv* đến hàm lượng tinh bột tích lũy trong cả lá cây *Arabidopsis* và củ khoai tây đã thấy rằng việc biểu hiện quá mức gen *ssiv* làm tăng sự tích lũy tinh bột trong cả cơ quan quang hợp và cơ quan dự trữ [5].

Như vậy, việc tạo cây thuốc lá chuyển gen *ssiv* tăng cường sinh tổng hợp tinh bột thông qua *Agrobacterium tumefaciens* hứa hẹn là một chiến lược trong cải tạo giống sản nhờ công nghệ sinh học. Các kết quả ở nghiên cứu này sẽ góp phần thúc đẩy mục tiêu cải tạo năng suất tinh bột ở cây trồng bằng công nghệ gen.

2. Đối tượng và phương pháp nghiên cứu

2.1. Đối tượng

- Giống sản KM140 được sử dụng để phân lập gen *ssiv* được thu thập từ Trung tâm tài nguyên thực vật, Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam.

- Giống thuốc lá K326 được nuôi cấy *in vitro* do phòng Công nghệ Tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học cung cấp.

- Chủng vi khuẩn *E.coli* DH5 α được sử dụng để nhân dòng gen *ssiv* và chủng vi khuẩn *A.tumefaciens* C58 PGV2260 do Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học cung cấp.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Phân lập gen *ssiv* từ cây sản

RNA tổng số được tách chiết từ củ của giống sản KM 140 nhờ sử dụng bộ kit tách chiết RNA thực vật (PureLink Plant RNA Reagent) của Invitrogen. cDNA được tổng hợp theo kit “RevertAidTM H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit” của Fermentas. Các bước thực hiện được tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất. DNA genome tạp nhiễm sau đó được loại bỏ bằng cách xử lý mẫu với ADNase I và RNA tổng số được tinh sạch bằng phương pháp tủa sử dụng *Lithium chloride* (LiCl). cDNA được tổng hợp từ RNA tổng số bằng kit tổng hợp cDNA (Invitrogen). Gen *ssiv* được nhân lên từ cDNA bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc là *SSIV_F* *EcoRI* (5'-**CACCATGGCGTCGAAGCTATCGACGTGGTTTCTG**-3') và *SSIV_R* (5'-**TTAGACCTACTTGCTGCCGCTCTTG**-3'). Phản ứng được thực hiện với enzyme Pfu DNA polymerase với chu kỳ nhiệt như sau: 95°C/3 phút, 30 chu kỳ (95°C/40 giây, 56°C/30 giây, 72°C/4 phút) và 72°C/10 phút. Sản phẩm PCR được tinh sạch, tách dòng trong vector pK7WG2D.

Thiết kế vector chuyển gen

Gen *ssiv* được chèn vào vector pK7WG2D bằng kỹ thuật Gateway theo hướng dẫn của bộ Kit Gateway[®] LR Clonase[™] II. Sản phẩm của phản ứng được sử dụng để biến nạp vào tế bào

khả biến *E. coli* One Shot TOP10 và chọn lọc trên môi trường có bổ sung Spectinomycin 100 µg/ml. Để sàng lọc các dòng khuẩn lạc mang vector tái tổ hợp pK7WG2D/SSIV mong muốn, chúng tôi thực hiện phản ứng colony-PCR sử dụng cặp mồi đặc hiệu SSIV-Frag-F (5' - CCTCTCCTGAACAACCTCCA- 3') và SSIV-Frag-R (5' -GCAAACCTCCACCTTTTCC- 3') khuếch đại một đoạn ngắn gần 1 kb của gen *ssiv*. Các dòng khuẩn lạc cho kết quả PCR dương tính sẽ được chọn để nuôi cấy và tiến hành tách chiết plasmid, sau đó cắt kiểm tra bằng enzyme giới hạn *EcoRI*. Vector pK7WG2D/35S/SSIV được biến nạp vào vi khuẩn *A. tumefaciens* để phục vụ chuyển gen.

Chuyển gen

Mảnh lá thuốc lá cắt thành những mảnh nhỏ có diện tích 1 cm² được ngâm trong dịch huyền phù vi khuẩn *A. tumefaciens* mang vector chuyển gen pK7WG2D/SSIV có OD₆₀₀ = 0,6 trong 20 phút và được đặt lên môi trường đồng nuôi cấy GM (MS + 1mg/l BAP + 30g/l sucrose + 8g/l agar, pH=5,8), để tối. Sau hai ngày đồng nuôi cấy, chuyển các mảnh lá lên môi trường tái sinh và chọn lọc chồi GM có bổ sung kháng sinh diệt khuẩn cefotaxim 500 mg/l và kháng sinh chọn lọc kanamycin 50 mg/l. Sau 4 - 5 tuần các chồi tái sinh đạt chiều cao khoảng 3cm được chuyển sang môi trường ra rễ chọn lọc RM (MS + 0,1mg/l IBA + 30g/l sucrose + 8g/l agar + cefotaxime 500mg/l, kanamycin 50mg/l, pH = 5,8). Sau 3 đến 4 tuần cây phát triển hoàn chỉnh, ra rễ và có từ 3 - 4 lá thật được chuyển ra bầu có trộn trấu và cát với tỉ lệ 1:1. Cây phát triển với 4 đến 5 lá thật được chuyển ra trồng trong bầu đất chứa giá thể TN1 (Viện Nông hóa thổ nhưỡng) ở điều kiện nhà kính.

Kiểm tra các dòng thuốc lá chuyển gen bằng phương pháp PCR

Các cây thuốc lá sau chuyển gen 4 tuần tuổi đã chọn lọc trên môi trường kanamycin được kiểm tra sự có mặt của gen chuyển bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu SSIV-Frag-F (5' -CCTCTCCTGAACAACCTCCA- 3') và SSIV-Frag-R (5' - GCAAACCTCCACCTTTTCC- 3'). Phản

ứng PCR được tiến hành với tổng thể tích 20 µl gồm: 1 µl DNA, 10 µl DreamTaq PCR Master Mix 2X, 1 µl mồi xuôi, 1 µl mồi ngược và 7 µl nước khử ion vô trùng. Quá trình nhân gen theo chu kỳ nhiệt: 94°C/3 phút; 25 chu kỳ [94°C/1 phút, 58°C/30 giây, 72°C/1 phút]; 72°C/10 phút. Sản phẩm của phản ứng được điện di kiểm tra trên gen agarose 0.8%. Do kích thước phân lập của gen *ssiv* quá lớn (~ 3,5 kb) nên chúng tôi chỉ khuếch đại 1 phần của đoạn gen (~ 1kb). Các dòng thuốc lá dương tính với phản ứng PCR nếu xuất hiện băng kích thước 1089 bp.

Đánh giá sự biểu hiện của gen chuyển bằng phương pháp phân tích hàm lượng tinh bột

Sự biểu hiện của gen *ssiv* được xác định bằng phương pháp phân tích hàm lượng tinh bột sử dụng thuốc thử Anthrone khi hòa tan trong acid sulfuric 72% [9]. Trong môi trường này, glucose sẽ tạo dạng vòng 5 cacbon và phản ứng với thuốc thử thông qua nhóm -CHO tạo ra sản phẩm có màu xanh, có độ hấp thụ cực đại ở bước sóng 630nm. Mẫu lá thuốc lá được thu ở cùng một thời điểm và độ tuổi ở các dòng chuyển gen và WT ở cùng độ tuổi, trong cùng thời gian (nhiệt độ 27°C, độ ẩm 70%, điều kiện chiếu sáng 16h/ngày, sau đó được sấy khô và loại bỏ diệp lục bằng cách chiết với acetone 100%. Hàm lượng đường tự do trong mẫu cần được khử với cồn 80% sau đó tinh bột ở mẫu được thủy phân trong acid để tạo ra các phân tử đường glucose.

3. Kết quả và thảo luận

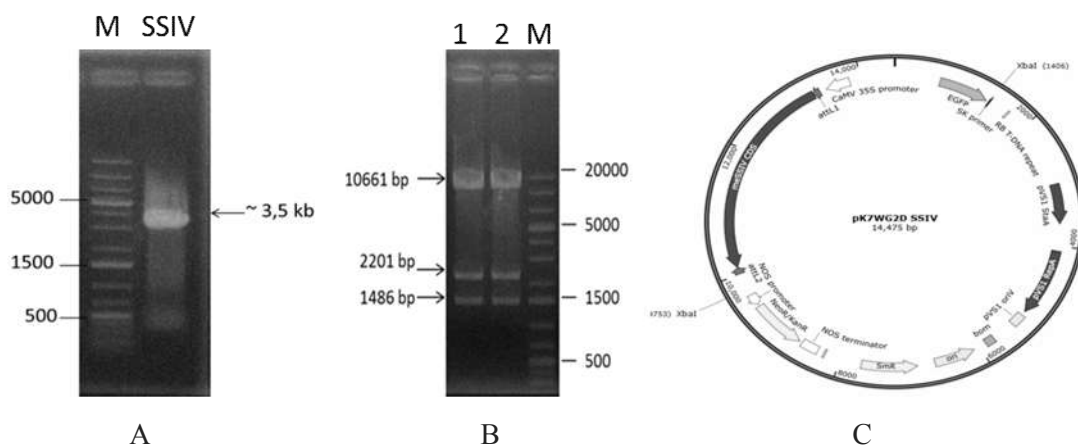
3.1. Kết quả phân lập gen *ssiv* từ cây sản và thiết kế vector chuyển gen thực vật pK7WG2D-35S:SSIV:T35S

Gen *ssiv* được khuếch đại thành công thể hiện qua kết quả điện di sản phẩm PCR (Hình 1A). Đoạn DNA có kích thước gần 3,5 kb tương đương với kích thước đoạn CDS của gen *ssiv* theo lý thuyết. Kết quả đọc trình tự gen cho

thấy, sản phẩm gen tách dòng từ mẫu nghiên cứu có kích thước 3189 bp. Trình tự gen *ssiv* phân lập được từ giống sắn KM140 đã được đăng kí trên ngân hàng GenBank với mã số KT033500. Chúng tôi đã phân lập thành công gen *ssiv* từ cây sắn.

Việc gắn thành công gen *ssiv* vào vector pK7WG2D được thể hiện qua kết quả colony-PCR và kết quả cắt kiểm tra bằng enzyme giới hạn *EcoRI* (Hình 1B). Kết quả colony-PCR với

cặp mồi đặc hiệu SSiv-Frag-F/SSiv-Frag-R cho đoạn DNA có kích thước đúng với tính toán lý thuyết. Kết quả điện di sản phẩm của phản ứng cắt cho thấy đã chọn được các dòng plasmid tái tổ hợp pK7WG2D-35S:SSIV:T35S cho các băng DNA đúng kích thước theo tính toán lý thuyết là: 10661 bp, 2201 bp và 1486 bp. Như vậy, vector pK7WG2D-35S:SSIV:T35S đã được thiết kế thành công (Hình 1B, C).



Hình 1. Kết quả phân lập gen *SSiv* từ cây sắn và thiết kế vector chuyển gen thực vật pK7WG2D-35S:SSIV:T35S. A. Điện di sản phẩm PCR phân lập gen. B. Kết quả kiểm tra sản phẩm cắt plasmid pK7WG2D-35S:SSIV:T35S bằng *EcoRI*. C. Sơ đồ vector pK7WG2D-35S:SSIV:T35S.

3.2. Chuyển gen *ssiv* vào cây thuốc lá thông qua *A. tumefaciens*

Trong chuyển gen thực vật, cây thuốc lá được xem 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 thu hạt để nghiên cứu các thế hệ tiếp theo. Bởi vậy, trong nghiên cứu này chúng tôi chọn cây thuốc lá làm cây mô hình để đánh giá các cấu trúc vector chuyển gen tăng cường tích lũy tinh bột đã thiết kế. Kết quả chuyển gen quan tâm vào cây mô hình thuốc lá thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* như sau:

Bảng 1. Kết quả biến nạp vector chuyển gen vào mảnh lá thuốc lá

Gen chuyển	Lô thí nghiệm	Số mảnh lá biến nạp	Số mẫu tạo chồi/MT tái sinh	Số chồi ra rễ/MT ra rễ	Số cây sống sót khi ra bầu trấu cát
			+ 50 mg/l Kana	+ 50 mg/l Kana	
pK7WG2D/SSIV	1	50	35	30	30
	2	50	29	25	23
	3	50	31	27	24
Tổng số		150	95	82	77

Kết quả thu được sau 3 lô thí nghiệm chuyển gen mang cấu trúc pK7WG2D-35S:SSIV:T35S vào 150 mảnh lá cây thuốc lá K326 thông qua *A. tumefaciens* và thu được 77

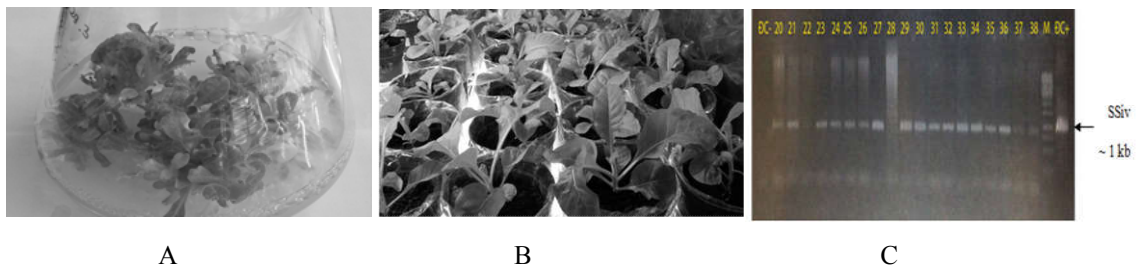
dòng cây thuốc lá chuyển gen tăng cường tích lũy tinh bột trên môi trường chọn lọc bằng kana. Ngược lại, những mảnh thuốc lá không chuyển gen khi cấy trên môi trường chọn lọc có kana (làm đối chứng), 100% mẫu bị chết và không tái sinh chồi. Đây là kết quả có tiềm năng cho những cây tái sinh và ra rễ trên môi trường chọn lọc là những dòng chuyển gen. Lựa chọn 30 chồi cây thuốc lá đã phát triển thành cây hoàn chỉnh, đủ lớn, cao khoảng 3 - 5 cm được chuyển từ điều kiện nuôi cấy *in vitro* ra bầu đất trồng tại nhà kính, phục vụ cho các phân tích tiếp theo.

3.4. Kiểm tra cây chuyển gen bằng phương pháp PCR

Những mảnh lá thuốc lá sau khi tái sinh trên môi trường chọn lọc được chuyển sang môi trường ra rễ chọn lọc có tiềm năng là các dòng

đã được chuyển gen (Hình 2A). Kết quả thu được các cây con ra rễ và phát triển hoàn chỉnh với 3 - 4 lá thật trong bồn sinh trưởng sau 4 tuần (Hình 2B).

PCR là kỹ thuật phổ biến và đơn giản nhất để bước đầu sàng lọc các dòng cây chuyển gen. Kết quả của phản ứng cho phép khẳng định sự tồn tại hay không tồn tại của gen chuyển trong genome cần kiểm tra. Trong nghiên cứu này, kết quả phản ứng PCR với cặp mồi SSIV- Frag_F/R từ cây thuốc lá chuyển gen cho thấy đã thu được 25 dòng thuốc lá chuyển gen mang cấu trúc vector *pK7WG2D/SSIV*. Các dòng này cho kết quả PCR dương tính với sản phẩm là đoạn DNA có kích thước là 1089 bp đúng theo tính toán lý thuyết (Hình 2C). Như vậy chúng tỏ gen *ssiv* đã được chuyển gen thành công vào những dòng thuốc lá này.



Hình 2. A. Mảnh lá thuốc lá tái sinh. B. Cây thuốc lá ở vườn ươm. C. Kết quả kiểm tra các dòng thuốc lá chuyển gen *ssiv* bằng phản ứng PCR (M: thang DNA chuẩn 1 kb).

3.5. Đánh giá sự biểu hiện của gen chuyển bằng phương pháp phân tích hàm lượng tinh bột

Trong điều kiện *in vitro*, cây non được cung cấp đầy đủ dinh dưỡng và ánh sáng. Do vậy, đánh giá sự tích lũy tinh bột ở lá *in vitro* là không phù hợp, vì trong môi trường nuôi cấy *in*

vitro có bổ sung đường nên kết quả thu được sẽ không chính xác. Để kết quả được chính xác nhất chúng tôi tiến hành trồng tất cả các mẫu trong bồn sinh trưởng để đảm bảo thống nhất các điều kiện như thời gian chiếu sáng, nhiệt độ, độ ẩm...

Bảng 2. Kết quả đo hàm lượng tinh bột tích lũy trong lá và trong rễ cây thuốc lá ở các dòng chuyển gen T0

Tên dòng	Hàm lượng tinh bột trung bình (mg/ml)		Hàm lượng tinh bột/trọng lượng mẫu khô (mg/g)		Tỉ lệ tinh bột ở các mẫu tăng so với đối chứng (%)	
	Lá	Rễ	Lá	Rễ	Lá	Rễ
S5	1,156	0,112	578,117	56,235	41,883	13,743
S11	1,112	0,062	556,050	31,182	36,467	7,608
S16	1,034	0,082	517,280	41,927	26,952	10,062
S24	1,165	0,144	582,715	72,015	43,011	17,670
S31	1,187	0,056	593,621	28,514	45,688	6,871
S40	1,368	0,081	684,115	40,502	67,895	9,939
WT	0,815	0,015	407,460	0,751	0,000	0,000

Ghi chú: WT: cây chưa chuyển gen. S5, S11, S16, S24, S31, S40: các dòng chuyển gen *ssiv*

Cho đến nay, việc ứng dụng công nghệ sinh học tác động đến hoạt động của gen *ssiv* nhằm mục đích cải biến năng suất và chất lượng tinh bột ở cây chuyển gen đã được một số nhóm nghiên cứu trên thế giới thực hiện. Kết quả đánh giá cây thuốc lá chuyển gen *Mut - ssiv* xuất hiện các kiểu hình sinh trưởng kém hơn so với đối chứng. Mặt khác, hàm lượng polysaccharide dự trữ không khác biệt so với đối chứng [6]. Tuy nhiên, các cây chuyển gen có sự suy giảm về số lượng hạt tinh bột cùng với đó là sự tăng về kích thước các hạt tinh bột trong lá. Tương tự, khi chuyển gen *ssiv* vào cây thuốc lá đã thu được cây có khả năng sinh trưởng, phát triển tốt hơn cũng như hàm lượng tinh bột tích lũy trong lá cao hơn 30 - 40% khi tăng cường biểu hiện gen *ssiv* và cho phép tăng cường đến 50% hàm lượng tinh bột trong lá vào thời điểm cuối ngày so với cây đối chứng [2].

Dựa trên định lượng hàm lượng tinh bột hay hàm lượng đường hòa tan có trong lá, rễ của các dòng thuốc lá chuyển gen bằng Anthrone. Đây là phương pháp đơn giản nhưng hữu hiệu để bước đầu sàng lọc, lựa chọn các dòng chuyển gen tiềm năng để tiếp tục thực hiện các phép phân tích định lượng phức tạp và chính xác hơn. Kết quả xác định hàm lượng tinh bột tích lũy trong lá các dòng thuốc lá chuyển gen cho thấy hầu hết trong lá của các dòng thuốc lá chuyển gen *ssiv* đều tích lũy một lượng tinh bột lớn hơn từ 26,9 - 67,9% so với lượng tinh bột trong lá cây đối chứng không chuyển gen (Bảng 2). So sánh với kết quả khi chuyển gen thực vật đồng biểu hiện 2 gen mã hóa tiểu phần lớn AGPL và tiểu phần nhỏ AGPS của enzyme AGPase trên lá cây thuốc lá đã chứng minh sự tích lũy tinh bột vượt trội từ 13 - 116% [3]. Bên cạnh đó cũng đã có kết quả chứng minh sự hoạt động của cấu trúc 35S-AGPopt trong các dòng thuốc lá chuyển gen giúp tăng hàm lượng tinh bột tích lũy trong lá từ 18 - 56% so với cây đối chứng không chuyển gen [4]. Điều này có thể giải thích vị trí gen chuyển được tích hợp trong genome cây chủ khác nhau dẫn đến sự sai khác trong hoạt động của gen chuyển, ảnh hưởng đến quá trình sinh tổng hợp và tích lũy tinh bột.

Hàm lượng tinh bột ở trong rễ các dòng thuốc lá chuyển gen đều tích lũy hàm lượng tinh bột lớn hơn từ 6,8 - 17,6% lượng tinh bột trong rễ cây không chuyển gen. Cụ thể ở dòng S24 có hàm lượng tinh bột trong rễ đạt cao nhất (17,6%), tiếp đến là S5 (13,7%), S16 (10,0%). Kết quả này cho phép khẳng định các dòng thuốc lá chuyển gen *ssiv* có mức độ tích lũy tinh bột trong lá và rễ cao hơn cây đối chứng không chuyển gen. Tương tự khi nghiên cứu chuyển gen *ssiv* trên cây khoai tây, thu được củ khoai tây có hàm lượng tinh bột trung bình tăng từ 6 - 21% so với các cây WT trong điều kiện những cây này được trồng trong nhà kính và điều kiện đồng ruộng tương ứng [2].

Kết luận: Như vậy, chúng tôi đã phân lập và thiết kế thành công vector chuyển gen thực vật mang đoạn gen *ssiv* liên quan đến quá trình tích lũy tinh bột. Hoạt động của các gen đã được đánh giá trên cây thuốc lá mô hình và chứng minh sự tích lũy tinh bột thể hiện trong lá 26,9 - 67,9%; rễ 6,8 - 17,6% ở các dòng thuốc lá chuyển gen so với cây đối chứng. Kết quả này là bước đầu để phát triển các nghiên cứu dụng tăng cường dự trữ tinh bột ở các cây trồng khác như: sắn, ngô, khoai tây...

Lời cảm ơn

Công trình được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài: “Khai thác và phân lập nguồn gen có sẵn của tập đoàn giống sắn Việt Nam nhằm phát triển các giống sắn có khả năng chống chịu bệnh và năng suất cao bằng công nghệ gen” thuộc nhiệm vụ hợp tác quốc tế về khoa học và công nghệ. Các thí nghiệm này được thực hiện tại phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

Tài liệu tham khảo

- [1] Alisdair, R.F., Willmitzer, L. & Trethewey, R.N. (2002) Sucrose to starch: a transition in molecular plant physiology. Trends in Plant Science 7, 35-41.
- [2] Gamez FMA, Jun L, Sandy R, Edurme BF, Francisco JM, Miroslav O, Paula R, Abdellatif B, Javier PR, Angel M (2011) Enhancing the expression of starch

- synthase class IV results in increased levels of both transitory and long-term storage starch. *Plant Biotechnol J* 9: 1049-1060.
- [3] Nguyễn Văn Đoài, Nguyễn Thị Minh Hồng, Lê Thu Ngọc, Nguyễn Thị Thom, Nguyễn Đình Trọng, Vũ Huyền Trang, Nguyễn Thị Thủy Hương, Phạm Thị Vân, Phạm Bích Ngọc. Đánh giá khả năng tăng cường tích lũy tinh bột ở cây thuốc lá chuyển gen AGPS và AGPL mã hóa enzyme agpase ở cây sắn. *Tạp chí CNSH* tập 14, số 2 - 2016, 287 - 293.
- [4] Lê Thu Ngọc, Nguyễn Mậu Hưng, Đinh Văn Hùng, Nguyễn Thị Minh Hồng, Phạm Bích Ngọc, Chu Hoàng Hà. Tăng cường quá trình sinh tổng hợp tinh bột ở mô hình cây thuốc lá thông qua việc chuyển gen mã hóa ADP glucose pyrophosphorylase của vi khuẩn. *Tạp chí CNSH* tập 14, số 1 - 2016, 139 - 148.
- [5] Regierer B, Femie AR, Springer F, Perez-Melis A, Leisse A, (2002) Starch content and yield increase as a result of altering adenylate pools in transgenic plants. *Nat. Biotech.* 20:1256-60
- [6] Roldan I, Lucas MM, Delvalle D, Planchot V, Jimenez S, Perez R, Ball S, D'Hulst C, Merida A. (2007) The phenotype of soluble starch synthase IV defective mutants of *Arabidopsis thaliana* suggests a novel function of elongation enzymes in the control of starch granule formation. *Plant J* 49: 492-504.
- [7] [Shewmaker CK, Boyer CD, Wiesenborn DP, Thompson DB, Boersig MR, Oakes JV, Stalker DM (1994) Expression of *Escherichia coli* glycogen synthase in the tubers of transgenic potatoes (*Solanum tuberosum*) results in a highly branched starch. *Plant Physiol* 104: 1159-1166.
- [8] Stark DM et al. (1992) Regulation of the amount of starch in plant tissues by ADP-glucose pyrophosphorylase. *Science* 258, 287-292
- [9] Yemm EW, Willis AJ (1954) The estimation of carbohydrates in plant extracts by anthrone. *Biochem J* 57:508-14.
- [10] Zeeman, Samuel C. (2010) Starch: Its Metabolism, Evolution, and Biotechnological Modification in Plants. *Annual Review of Plant Biology* 61(1).

Researching on the Generation of *ssiv* Gene Transgenic Tobacco Plants using *Agrobacterium tumefaciens*

Nguyen Thi Minh Hong^{1,2}, Le Thu Ngoc¹, Nguyen Khac Hung¹,
Nguyen Thi Thom¹, Pham Bich Ngoc¹

¹*Biotechnology Institute, Vietnam Academy of Science and Technology*
²*Hong Duc University*

Abstract: Increasing starch yield using gene technology is one of the most important research priorities and is of primary interest to scientists. Therefore, studies on the pathway of starch synthesis and decomposition in plants in general and for cassava in particular could contribute to promoting the goal of improving starch yield. In higher plants, starch synthase (SS) enzymes are encoded by five gene groups called *GBL* (granule-bound starch synthase), *SSI*, *SSII*, *SSIII*, and *SSIV*. In particular, each SS enzyme variant has different constituents and certain roles in amylopectin synthesis. In this study, *ssiv* gene from the KM140 cassava was isolated. *Ssiv* gene was inserted into pK7WG2D-35S:SSIV:T35S vector. Afterward, this new vector was transformed into tobacco plants using *Agrobacterium tumefaciens*. The success of transformation was checked by PCR and evaluation of gene expression was performed by analyzing the starch content. The results indicated that the starch content in transgenic plants was much more higher in comparison to the control at the same growing conditions (leaves 26,9 - 67,9%, roots 6,8 - 17,6%). This research could lead to a new direction in the creation of genetically modified crops that had the potential of increasing starch accumulation.

Keywords: Gene transference; starch; cassava; *ss* (starch synthase); *ssiv*.