

NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG TIẾP NHẬN GEN CỦA MỘT SỐ GIỐNG ĐẬU TƯƠNG [*Glycine max* (L.) Merr.] CỦA VIỆT NAM THÔNG QUA VI KHUẨN *Agrobacterium tumefaciens*

Nguyễn Tiến Dũng*, Ngô Xuân Bình

Tóm tắt

Nghiên cứu khả năng tiếp nhận gen của một số giống đậu tương Việt Nam thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* được tiến hành theo phương pháp của Margie M. Paz và cộng sự (2005). Hạt của 20 giống đậu tương được ngâm khử trùng 20h trước khi tiến hành lây nhiễm với vi khuẩn *A.tumefaciens*. Nửa hạt có chứa phôi mầm được lây nhiễm với dịch vi khuẩn EHA105 mang vector nhệ thể pCambia3301 chứa gen chỉ thị GUS. Sau 14 ngày tái sinh chồi, tiến hành đánh giá khả năng tiếp nhận gen thông qua biểu hiện tạm thời của gen GUS. Kết quả cho thấy, tỷ lệ biểu hiện gen (số mẫu GUS⁺/ tổng số mẫu kiểm tra) dao động từ 16-90% (trung bình đạt 70,10%). Trong đó, các giống DT84, ĐVN6, ĐVN9, DT90 có tỷ lệ biểu hiện cao (76-90%), mức độ biểu hiện tốt (+++). Đây là những giống có khả năng sử dụng làm vật liệu để chuyển các gen quan tâm, tạo giống đậu tương biến đổi gen của Việt Nam.

Từ khóa: *Agrobacterium*, chuyển gen, đậu tương, half-seed.

Đặt vấn đề

Đậu tương [*Glycine max* (L.) Merr.] là cây trồng quan trọng trên thế giới, là nguồn cung cấp protein cho con người. Tính đến năm 2009, diện tích đậu tương chuyển gen được đưa ra trồng đại trà đạt khoảng 170 triệu ha (Clive James, 2010) và là cây trồng chuyển gen được trồng nhiều nhất trên thế giới. Hai hệ thống chuyển gen ở đậu tương là chuyển gen thông qua nốt lá mầm (coty node) và thông qua phôi vô tính (embryogenesis) được cho là có hiệu quả và được ứng dụng rộng rãi nhất. Phương pháp chuyển gen thông qua nốt lá mầm được Hinchee và cộng sự, 1998 lần đầu tiên nghiên cứu. Tiếp đến, nhiều nhóm tác giả ở các phòng thí nghiệm khác nhau trên thế giới tiến hành ứng dụng, nghiên cứu cải tiến phương pháp nhằm nâng cao hiệu quả biến nạp gen (P.M. Olhoft, 2001; P.M. Olhoft và D.A.Somers, 2001; Margie M. Paz và cs., 2004). Christianson và cộng sự, 1983 lần đầu tiên công bố kết quả tái sinh thông qua phôi vô tính. Tiếp sau đó, một số tác giả đã cải tiến và tối ưu môi trường, xây dựng phương pháp tái sinh thông qua phôi vô tính ở giai đoạn quả non (Finer,J.J. và A. Nagasawa,1988; Young Jin Kim và cs., 2004; Susumu Hiraga và cs., 2007). Nhược điểm của cả hai phương pháp trên là tiêu tốn nhiều thời gian, hiệu quả biến nạp gen chỉ đạt từ 0,3 đến 2,8%. Vì những nhược điểm này, một số nhà khoa học tiến hành thử nghiệm, tìm kiếm phương pháp mang lại hiệu quả cao hơn như chuyển gen qua trụ dưới (Geliang Wang và Yinong Xu, 2008), phôi đỉnh (Hai-Kun Liu và cs, 2004). Tuy nhiên, các phương pháp này cũng không mang lại hiệu quả, mặt khác ít được ứng dụng. Margie M. Paz và cộng sự, 2005 đã tiến hành cải tiến phương pháp nốt lá mầm không qua giai đoạn nuôi cấy nảy mầm trước khi lây nhiễm với vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. Phương pháp này có ưu điểm hơn các phương pháp trước đó là thời gian được rút ngắn, hiệu quả biến nạp nâng cao (3,8%). Cho tới nay, kết quả công bố về hiệu quả của phương pháp này vẫn cao hơn các phương pháp khác.

Ở Việt Nam, gần đây một số phòng thí nghiệm đã và đang tiến hành nghiên cứu chuyển gen đậu tương và bước đầu đã cho kết quả (Trần Thị Cúc Hòa, 2007, 2008). Tuy nhiên khả năng ứng dụng triển khai để tạo cây đậu tương biến đổi gen của Việt Nam vẫn còn hạn chế. Có nhiều yếu tố ảnh hưởng tới hiệu quả biến nạp gen, trong đó kiểu gen (genome type) có vai trò rất quan trọng. Nội dung của bài báo trình bày ứng dụng của phương pháp half-seed để nghiên cứu khả năng đáp ứng chuyển gen ở một số giống đậu tương của Việt Nam.

Vật liệu, phương pháp nghiên cứu

Vật liệu hạt

Thí nghiệm sử dụng hạt chín của 20 giống đậu tương Việt Nam (bảng 1) do Trung tâm Tài nguyên thực vật, Viện nghiên cứu Ngô, Viện Di truyền Nông nghiệp cung cấp. Hạt giống được gieo trồng, chăm sóc tại nhà lưới khu Công nghệ tế bào, Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên. Khi hạt chín sinh lý, tiến hành thu hái và bảo quản để sử dụng cho các thí nghiệm.

Vật liệu di truyền

Thí nghiệm sử dụng chủng vi khuẩn EHA105 mang vector nhệ thể pCambia3301 do trường Đại học Đông A Hàn Quốc cung cấp. Trong cấu trúc vector pCambia3301 có chứa gen chỉ thị GUS (β -

* Bộ môn CNSH, Khoa Công nghệ sinh học và Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên
Email: tiendungntt@yahoo.com

glucuronidase) được điều khiển bởi promoter CaMV 35S, gen chọn lọc ở thực vật là gen bar. Đoạn cassette mang gen được giới hạn bởi hai đầu LB và RB (hình 1)



Hình 1. T-DNA của plasmid pCambia3301 mang gen bar và gen gus, mỗi gen điều khiển bởi CaMV 35S promoter. LB: ranh giới trái, RB: ranh giới phải

Phương pháp nghiên cứu

Nghiên cứu dựa trên phương pháp “half-seed explant” của Margie M. Paz và cộng sự năm 2005.

Chuẩn bị chủng vi khuẩn và môi trường lây nhiễm

Chủng vi khuẩn EHA105 mang cấu trúc vector pCambia3301 được nuôi cấy trên môi trường YEP có chứa kanamycin 50mg/l, rifampicin 25mg/l ở 28⁰C. Trước khi tiến hành lây nhiễm 1 ngày, tế bào vi khuẩn được nuôi lắc với 200ml môi trường YEP lỏng có chứa kháng sinh tương ứng ở 28⁰C, 2500 vòng/phút. Mật độ vi khuẩn (OD₆₀₀) được kiểm tra bằng máy đo của hãng BECKMAN COULTER, OD₆₀₀ = 0.7-1.0 thích hợp cho lây nhiễm. Dịch vi khuẩn được chuyển sang ống corning 50ml, ly tâm 15 phút, 7000 vòng/phút. Thu cặn tế bào và pha loãng bằng dung dịch CCM lỏng dùng cho lây nhiễm với mẫu thí nghiệm.

Chuẩn bị hạt và mẫu lây nhiễm.

Hạt của 20 giống đậu tương được khử trùng bằng khí Clo (Cl₂) trong 20h (Cl₂ được tạo ra từ dung dịch gồm 5ml HCl 37% + 95ml NaOCl 5%). Ngâm hạt trong dung dịch NaOCl 1% 20h. Đưa hạt ra đĩa Petri, dùng dao cây số 11 tách bỏ vỏ, ½ lá mầm. Mẫu dùng cho lây nhiễm là ½ lá mầm còn lại chứa đầy đủ phôi mầm (sau đây được gọi là mẫu nuôi cấy) (hình 2-A). Mẫu nuôi cấy được lây nhiễm với dịch vi khuẩn trong 30 phút. Mẫu lây nhiễm được thấm khô và đồng nuôi cấy trên môi trường CCM 5 ngày, ở 25⁰C, ẩm độ 70%.

Cảm ứng tạo chồi và chọn lọc chồi chuyển gen

Sau 5 ngày đồng nuôi cấy, mẫu lây nhiễm được rửa bằng dung dịch SIM (B5 salts và B5 vitamin) lỏng có chứa kháng sinh thích hợp, sau đó nuôi cấy trở lại trên môi trường SIM rắn không có chất chọn lọc (PPT) 14 ngày, ở 25⁰C. Sau 14 ngày, chuyển mẫu nuôi cấy sang môi trường SIM có bổ sung chất chọn lọc PPT 10mg/l, chọn lọc chồi được chuyển gen sau 14 ngày (chọn lọc lần 1). Lựa chọn chồi sống sót sau lần chọn lọc thứ nhất chuyển sang môi trường mới có chứa PPT 5mg/l và kéo dài chồi (chọn lọc lần 2). Sau 2 lần chọn lọc, chồi được cấy chuyển sang môi trường kéo dài và ra rễ tạo cây hoàn chỉnh

Xác nhận gen GUS

Sau 14 ngày trên môi trường cảm ứng tạo chồi SIM, mẫu cây được nhuộm với dung dịch X-gluc để đánh giá khả năng tiếp nhận gen của các giống đậu tương thí nghiệm thông qua sự biểu hiện tạm thời của gen GUS theo phương pháp của Jefferson và cs., 1987. Khả năng tiếp nhận gen được đánh giá dựa trên tổng số mẫu có biểu hiện màu xanh chàm trong tổng số mẫu kiểm tra. Mức độ biểu hiện của gen GUS được đánh giá dựa trên vùng biểu hiện màu, độ đậm của màu. (+++: màu đậm, vùng biểu hiện rộng; ++ : màu và vùng biểu hiện trung bình; +: màu, nhạt, vùng biểu hiện hẹp).

Kết quả và thảo luận

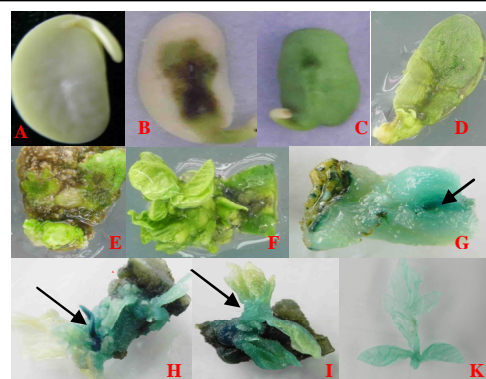
Khả năng tái sinh của các giống

Khả năng tái sinh chồi của các giống nghiên cứu có sự khác biệt rõ rệt trong cùng điều kiện nuôi cấy. Tỷ lệ tái sinh chồi (có chồi bật lên) dao động từ 56,25-92,00%. Nhóm giống có khả năng tái sinh cao gồm VCB, Cọc Chùm, ĐVN6, KW, DT2003, DT90 (bảng 1). Khả năng tái sinh của giống có vai trò quan trọng trong thành công của mỗi phương pháp chuyển gen. Tuy nhiên, ngoài các yếu tố do môi trường nuôi cấy thì kiểu gen của giống vẫn giữ vai trò chủ đạo chi phối đặc tính này. Quá trình nghiên cứu chúng tôi nhận thấy sự khác biệt ở một vài giống có kích thước hạt lớn như DT2008, ĐVN11, ĐVN5. Hạt của các giống này nếu ở cùng thời gian ngâm xử lý 20h trong nước, hạt trở nên mềm, dễ bị nứt, gãy hay làm tách rời trụ phôi khi nuôi cấy. Khả năng tái sinh cũng bị ảnh hưởng quá trình xử lý HCl, giống DT 2008, DT 84, nếu thời gian xử lý với HCl 20h, sức sống của mẫu giảm (hình 2-B). Sức sống của mẫu là điều kiện rất quan trọng khi thực hiện phương pháp half – seed. Mẫu cây chuyển màu xanh đặc trưng của giống sau 5 ngày trên môi trường đồng nuôi cấy được xem là yếu tố quyết định đến các giai đoạn nuôi cấy sau đó (hình 2-C,D). Một đặc tính khác cũng có vai trò rất quan trọng đó là đặc tính đa chồi của giống. Đặc tính đa chồi (3 chồi/mẫu trở lên – hình 2-F) ảnh hưởng đến hiệu quả chuyển gen sau này. Trong 20 giống đậu tương nghiên cứu, khả năng tạo đa chồi của các giống tương đối tốt, đáp ứng được yêu cầu (3 chồi trở lên). Nhiều tác giả đã nghiên cứu, đánh giá khả năng tái sinh ở nhiều giống đậu tương khác nhau nhằm tìm ra giống thích hợp cho

chuyển gen. P.M. Olhoft và cộng sự, 2001 đã tăng tỷ lệ đa chồi bằng cách loại bỏ chồi đỉnh. Thực tế, thao tác loại bỏ chồi đỉnh đã làm tăng tỷ lệ tạo đa chồi lên gấp nhiều lần. Do vậy, ngoài phụ thuộc vào đặc tính của giống, kỹ thuật nuôi cấy có vai trò rất lớn (hình 2-E mẫu không tạo đa chồi do thao tác).

Bảng 1: Khả năng tiếp nhận gen của một số giống đậu tương

STT	Giống	Tổng số mẫu	Tỷ lệ nảy chồi	GUS ⁺ /50 mẫu nhuộm	Tỷ lệ (%)	Mức độ biểu hiện
1	KW	92	85,87	40	80	++
2	ĐT26	115	60,87	35	70	++
3	DT84	123	62,60	41	82	+++
4	DT90	100	86,00	38	76	+++
5	DT96	100	79,00	41	82	++
6	DT2003	100	88,00	37	74	++
7	DT2008	96	56,25	35	70	++
8	DVN5	95	70,53	24	48	++
9	ĐVN6	100	83,00	45	90	+++
10	ĐVN9	100	64,00	44	88	+++
11	DVN10	112	67,86	36	72	++
12	DVN11	99	66,67	26	52	+
13	Đ2101	100	65,00	31	62	+
14	VX93	100	79,00	39	78	++
15	ĐT22	108	79,63	33	66	+
16	Cọc Chùm	100	89,00	28	56	++
17	VCB	100	92,00	41	82	++
18	VMK	117	74,36	42	84	++
19	Thọ Xuân	100	76,00	37	74	++
20	A28	97	60,82	8	16	+



Hình 2: chuyển gen thông qua *Agrobacterium tumefaciens*

A- half-seed dùng lây nhiễm với *A. tumefaciens*; B- mẫu bị tổn thương do hóa chất khử trùng; C, D- mẫu có màu xanh đặc trưng của giống; E- Mẫu tái sinh kém; F- Mẫu tái sinh tốt; G- Biểu hiện của gen gus (màu xanh-hương mũi tên) sau 5 ngày đồng nuôi cấy; H-K: Biểu hiện của gen gus sau tái sinh chồi 14 ngày

Biểu hiện của gen GUS

Sự biểu hiện của gen GUS ở các giống được kiểm tra sau 14 ngày nuôi cấy tái sinh trên môi trường SIM không có chất chọn lọc. Kết quả cho thấy, tỷ lệ biểu hiện tạm thời của gen thông qua gen GUS dao động từ 16-90%. Trong đó các giống ĐVN6, ĐVN9, DT84, VMK, VCB có tỷ lệ biểu hiện cao hơn các giống khác (trên 80%). Khả năng tiếp nhận gen của các giống dựa trên màu sắc, vùng biểu hiện của gen GUS nhận thấy các giống DT84, DT90, ĐVN6, ĐVN9 có khả năng tiếp nhận gen tốt (+++) (hình 2-H-K), các giống có mức độ tiếp nhận gen yếu gồm A28, ĐT22 (+). Các giống còn lại có khả năng tiếp nhận gen ở mức độ trung bình (++).

Gen GUS là gen chỉ thị, được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu chuyển gen thực vật. Phần lớn gen GUS được sử dụng với vai trò thông báo, nghiên cứu chức năng của cấu trúc vector, chủng vi khuẩn hay sự tiếp nhận gen tạm thời của các đối tượng quan tâm. Kết quả thu được cho thấy, hiệu quả biểu hiện gen tạm thời thông qua gen GUS ở các giống đậu tương khá cao (bảng 1). Điều này chứng tỏ cấu trúc vector pCambia3301 và chủng vi khuẩn EHA105 tương đối thích hợp với chuyển gen đậu tương. Cùng hệ thống vector trên, Trần Cúc Hòa, 2007 đã sử dụng biến nạp cho 42 giống đậu tương khác nhau bằng phương pháp nốt lá mầm và thu được kết quả khá cao ở tỷ lệ biểu hiện tạm thời của gen GUS (trung bình 60,4%). Kết quả phân tích Southern blot cho thấy hiệu quả chuyển gen đạt 2-5% (Trần Thị Cúc Hòa, 2008). Phương pháp half-seed rút ngắn được thời gian nuôi cấy này mầm hạt 3-5 ngày. Khả năng xâm nhiễm của *Agrobacterium* hiệu quả hơn, kết quả nghiên cứu này đã được Margie M. Paz và cộng sự chứng minh năm 2005. Nếu bỏ qua yếu tố do genotype chi phối, khi so sánh kết quả thu được của chúng tôi với kết quả của Trần Thị Cúc Hòa, 2007 thì phần nào cũng cho thấy hiệu quả của phương pháp.

Kết luận

Nghiên cứu khả năng tiếp nhận gen của một số giống đậu tương của Việt Nam thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* cho thấy hiệu quả biến nạp gen tạm thời thông qua biểu hiện của gen GUS khá cao, trung bình đạt 70,10%. Trong đó, một số giống như DT84, ĐVN6, ĐVN9, DT90 có tỷ lệ biểu hiện cao (76-90%), mức độ biểu hiện tốt (+++). Đây là những giống có tiềm năng phục vụ nghiên cứu tạo giống đậu tương biến đổi gen của Việt Nam

STUDY ON THE GENETIC RESPONSE CAPACITY OF SOME VIET NAM SOYBEAN CULTIVARS [*Glycine max* (L.) Merr.] VIA *Agrobacterium tumefaciens*

Nguyen Tien Dung[†], Ngo Xuan Binh

Summary

Our research was based on the Margie M. Paz et al method. Mature seeds of twenty soybean cultivars were sterilized and soaked in sterilization distilled water for 20 hrs before infected with *A.tumafaciens*. Half-seed explants which were including embryo axis were infected with *A.tumafeciens* EHA105 strain. The EHA105 strain carried a binary vector pCambia3301 containing GUS gene reporter. After 14 days on the shoot induction medium (SIM) we checked genetic response ability via GUS gene expression. The results showed that the GUS expression frequency were range from 16 to 90 percents (mean 70,10%). The DT84, ĐVN6, ĐVN9, DT90 cultivars were high GUS expression (76-90%) and strong expression (+++). These may useful cultivars for transform interested genes to make genetic soybean of Viet Nam.

Key words: *Agrobacterium*, half-seed, transformation, soybean.

Tài liệu tham khảo

1. Clive Jame, Báo cáo tóm tắt hiện trạng cây trồng biến đổi gen trên toàn cầu năm 2010, ISAAA
2. Trần Thị Cúc Hòa (2007) “Nghiên cứu khả năng đáp ứng chuyển nạp gen của các giống đậu tương trồng ở Việt Nam”, *Tạp chí Nông nghiệp & phát triển nông thôn* 18: 9-14.
3. Trần Thị Cúc Hòa (2008), “Hiệu quả tạo dòng đậu tương biến đổi gen từ giống MTĐ 176, HL 202, Maverick và William 82 bằng phương pháp nốt lá mầm qua trung gian *Agrobacterium tumefaciens*”, *Tạp chí Nông nghiệp & Phát triển nông thôn*, 1: 14-19.
4. Christianson, M.L,D.A. Wamick and P.S. Carlson (1983) A morphogenetically competent soybean suspension culture, *Science* 222:632-634
5. Finer,J.J. and A. Nagasawa (1988) Development of an embryogenic suspension culture of soybean, *Plant cell tissue Organ cult* 15: 126-136.
6. Geliang Wang and Yinong Xu (2008), Hypocotyl-based *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean (*Glycine max*) and application for RNA interference, *Plant Cell Rep* 27:1177–1184
7. Hai-Kun Liu, Chao Yang, Zhi-Ming Wei (2004) Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of soybeans using an embryonic tip regeneration system. *Planta* 219: 1042–1049
8. Jefferson, R.A., T.A. Kavanagh and M.V. Bevan (1987), “*GUS* fusions: b-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants”, *The EMBO Journal* vol.6 no. 13 pp.3901 -3907
9. Margie M. Paz, Huixia S., Zibiao G., Zhanyuan Z., Anjan K. B. & Wang K. (2004), “Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant”, *Euphytica*, 136, pp. 167-169.
10. Margine M.Paz, Juan Carlos Martinez, Andrea B.Kalvig, Tina M.Fonger, Kan Wang (2005), “Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation”, *Plant Cell Rep*, 206-213
11. P.M. Olhoft, K. Lin ,J. Galbraith, N.C. Nielsen and D.A. Somers (2001), “The role of thiol compounds in increasing *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean cotyledonary-node cells”, *Plant Cell Rep*. 20:731–737
12. P.M.Olhoft and D.A.Somers (2001), “L-Cysteine increases *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells”, *Plant Cell Rep* 20:706–711
13. Susumu Hiraga, Hiroshi Minakawa, Koji Takahashi, Ryoji Takahashi, akita Hajika, Kyuya Harada, Norihiro Ohtsubo (2007) Evaluation of somatic embryogenesis from immature cotyledons of Japanese soybean cultivars, *Plant Biotechnology* 24, 435-440.
14. Young Jin Kim, Tae Il Park, Hyun Soon Kim, Ho Ki Park, Sang Uk Chon, Song Joong Yun (2004) Factors affecting soma embryogenesis from immature cotyledon of soybean, *Journal of plant biotechnology*, vol.6, pp 45-50

[†] Department of biotechnology, Faculty of Biotechnology and Food technology, TUAFF
Email:tiendungntt@yahoo.com