

NGHIÊN CỨU CHUYỂN GEN *GmNAC004* VÀO GIỐNG ĐẬU TƯƠNG ĐT22 THÔNG QUA VI KHUẨN *Agrobacterium*

Nguyễn Văn Đông¹, Nguyễn Anh Vũ¹,
Lê Thị Mai Hương¹, Nguyễn Trung Anh¹

TÓM TẮT

Các nghiên cứu gần đây đã xác định gen *GmNAC004* là một trong những gen thuộc nhóm gen *NAC* có liên quan chặt chẽ đến khả năng chịu hạn ở đậu tương. Trong nghiên cứu này, gen *GmNAC004* được sử dụng để biến nạp vào 2870 nốt lá mầm của giống đậu tương ĐT22 thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* mang vector *pZY101::RD29A::GmNAC004*. Phân tích cây đậu tương tái sinh sau quá trình chuyển gen đã thu được 8 dòng, vừa kháng thuốc trừ cỏ đồng thời cũng dương tính với phân tích PCR. Kết quả này cho thấy, gen *GmNAC004* đã được chuyển thành công vào giống đậu tương chọn lọc của Việt Nam với hiệu suất chuyển gen 0,28%.

Từ khóa: *Agrobacterium tumefaciens*, cây đậu tương (*Glycine max* (L.) Merr), chuyển gen, *GmNAC004*

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đậu tương (*Glycine max* (L.) Merr) là cây trồng lấy hạt và là cây cho dầu quan trọng bậc nhất trên thế giới, được trồng khắp các châu lục nhưng tập trung nhiều nhất ở Châu Mỹ với sản lượng thu được chiếm 84,9% tổng sản lượng đậu tương trên toàn thế giới, tiếp đến là Châu Á - 12,8% (FAOSTAT, 2014).

Hiện nay, thế giới đang phải đối mặt với hiện tượng ấm lên của khí hậu toàn cầu, tần suất và sự ảnh hưởng của hạn hán càng trở nên rõ rệt hơn. Ở Việt Nam, diện tích gieo trồng đậu tương liên tục suy giảm, từ gần 200 nghìn ha năm 2010 đến năm 2015 chỉ còn 100,8 nghìn ha với sản lượng đạt 146,4 nghìn tấn (Tổng cục Thống kê, 2015). Mỗi năm Việt Nam nhập khẩu 2,5 triệu tấn đậu tương, trong khi sản lượng đậu tương hàng năm thu được chỉ đáp ứng 18% nhu cầu trong nước. Sản lượng đậu tương trong nước thấp do diện tích sản xuất rất hạn chế kèm theo năng suất thấp, chủ yếu do hạn hán. Trước thực trạng đó, việc nghiên cứu phát triển những giống cây trồng mới có khả năng thích ứng, chống chịu tốt trong điều kiện hạn hán đang là một trong những mục tiêu hàng đầu của các nhà khoa học trên thế giới cũng như các nhà khoa học Việt Nam.

Các nhân tố phiên mã *NAC* là một trong nhóm lớn nhất của các chất điều hòa phiên mã trong thực vật, các thành viên của nhóm gen *NAC* đóng vai trò quan trọng điều khiển quá trình phiên mã kết hợp với phản ứng stress của thực vật. Công trình nghiên cứu của Lam Son Phan Tran và *ctv.* (2009) đã chỉ ra rằng ở đậu tương trong số 31 gen *GmNAC* thuộc nhóm gen điều khiển *NAC* được kiểm tra, có 9 gen liên quan đến khả năng chịu hạn, mặn và lạnh. Trong số các gen *GmNAC* này thì các gen ở NST số 1 (*GmNAC002*, *GmNAC003*, *GmNAC004*) có khả năng biểu hiện mạnh hơn cả. Năm 2014,

Henry T. Nguyen và *ctv.* đã nghiên cứu chuyển gen *GmNAC003* và *GmNAC004* sử dụng promoter 35S vào cây *Arabidopsis*, kết quả cho thấy cây chuyển gen *GmNAC004* so với cây đối chứng có sự gia tăng số lượng và chiều dài rễ trong điều kiện thường và tăng cao trong điều kiện hạn. Theo nghiên cứu mới nhất của Reem M. Hussain và *ctv.* (2017), đã xác định được 139 gen *GmNAC*, nghiên cứu cụ thể 28 gen *GmNAC* chọn lọc kết quả cho thấy biểu hiện gen *GmNAC* phụ thuộc vào kiểu gen; 8 trong số 28 gen chọn lọc (*GmNAC004*, *GmNAC021*, *GmNAC065*, *GmNAC066*, *GmNAC073*, *GmNAC082*, *GmNAC083* và *GmNAC087*) đã được phát hiện có mức độ biểu hiện cao ở các giống đậu tương chịu hạn. Nghiên cứu này xác định gen *GmNAC* có thể được xem là trọng tâm trong các nghiên cứu phát triển đậu tương chịu hạn cao trong tương lai.

Xuất phát từ những thực tế trên, nghiên cứu chuyển gen *GmNAC004* vào giống đậu tương ĐT22 thông qua vi khuẩn *Agrobacterium* để nâng cao khả năng chịu hạn được tiến hành.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

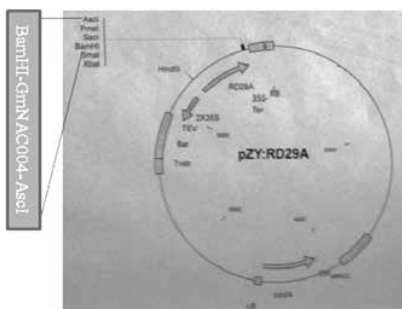
2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Vật liệu thực vật: Giống đậu tương ĐT22 (Nguồn: Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Đậu đỗ, Viện Cây lương thực và cây thực phẩm).

- Vật liệu di truyền:

Chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* EHA101 mang vector *pZY101::RD29A::GmNAC004* chứa gen chịu hạn *GmNAC004* và gen chỉ thị chọn lọc thực vật *bar* - kháng glufosinate (Hình 1), hiện đang được lưu giữ tại Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Tế bào Thực vật (Nguyễn Văn Đông và *ctv.*, 2012).

¹ Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ Tế bào thực vật, Viện Di truyền Nông nghiệp



Hình 1. Sơ đồ vector pZY101::RD29A:: GmNAC004

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp biến nạp

Phương pháp tạo vật liệu vô trùng và phương pháp chuyển gen vào cây đậu tương được tiến hành theo quy trình của Zhang (2004) có cải tiến để phù hợp với điều kiện phòng thí nghiệm (Nguyễn Văn Đồng và *ctv.*, 2012).

2.2.2. Phân tích cây chuyển gen

- Sàng lọc cây chuyển gen T0 và T1 thông qua xử lý với thuốc trừ cỏ basta

Cây con T0 và 30 - 35 cây T1 của mỗi một dòng T0 tương ứng của chúng được sử dụng trong thí nghiệm phun basta là những cây phát sinh khoảng 3 - 5 lá thật. Nồng độ basta sử dụng trong thí nghiệm chọn lọc là 100 mg/l. Thí nghiệm phun basta được

tiến hành lặp lại 3 lần, mỗi lần cách nhau 3 ngày. Những cây con sống sót sau 3 lần phun basta được tiếp tục chăm sóc làm vật liệu cho những phân tích đánh giá tiếp theo.

- Phân tích PCR

Quy trình tách chiết ADN được tiến hành theo quy trình tách chiết ADN của Doyle và CS (1987) được cải tiến cho phù hợp với điều kiện và hóa chất của phòng thí nghiệm. Tiến hành phân tích PCR với cặp mỗi RD29A-F/ RD29A-R đặc hiệu cho promoter RD29A, cặp mỗi BAR-F/ BAR-R đặc hiệu cho gen bar và cặp mỗi cdsNAC04-F/ RB-R đặc hiệu cho gen GmNAC004 (Bảng 1). Chương trình phản ứng chung của 3 cặp mỗi là 95°C/ 5phút, 95°C/ 30 giây, 57°C/ 30giây, 72°C/ 90 giây, lặp lại trong 35 chu kỳ, 72°C/ 10 phút, kết thúc 4°C; Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%.

- Các chỉ tiêu theo dõi và đánh giá

Các thông số sau được quan tâm để đánh giá hiệu quả chuyển gen:

+ Tỷ lệ mẫu phát sinh đa chồi (%) = Số mẫu phát sinh đa chồi × 100/ Tổng số mẫu lây nhiễm

+ Tỷ lệ mẫu sống sót sau chọn lọc (%) = Số mẫu kéo dài chồi × 100/ Tổng số mẫu đa chồi

Hiệu suất chuyển gen (%) = Số cây T0 có kết quả PCR dương tính × 100/ Tổng số mẫu ban đầu.

Bảng 1. Trình tự các đoạn mỗi sử dụng trong nghiên cứu

TT	Tên mỗi	Trình tự mỗi
1	RD29A-F	5'-ATGGGCCAATAGACATGGAC-3'
2	RD29A-R	5'-GGGACACGTATGAAGCGTCT-3'
3	BAR-F	5'-CTGAAGTCCAGCTGCCAGA-3'
4	BAR-R	5'-CCACTACATCGAGACCAGCA-3'
5	cdsNAC04-F	5'-CAAACCTCAATTGGGAAAGAGGGT-3'
6	RB-R	5'-CTTTTCTCTTAGGTTTACCCGCCA-3'

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Chuyển gen chịu hạn GmNAC004 vào giống đậu tương ĐT22

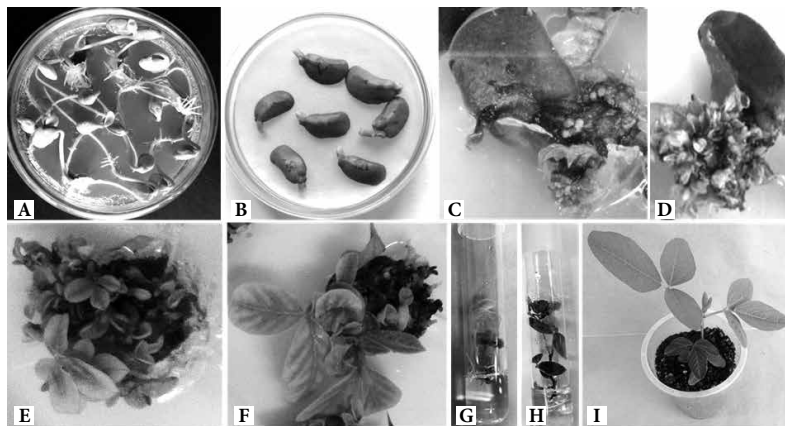
Quá trình biến nạp với 2870 mẫu nửa lá mầm trong tổng số 10 thí nghiệm đã thu được 63 cây chuyển gen thế hệ T0 sống sót khi đưa ra môi trường tự nhiên, tỉ lệ mẫu biến nạp tạo đa chồi đạt 64% và tỉ lệ mẫu sống sót sau giai đoạn chọn lọc đạt 4,68%. Theo nghiên cứu của Paz và *ctv.* (2006), 4 giống đậu tương Thorne, Williams, Williams79 và Williams82

được sử dụng làm nguyên liệu cho quá trình biến nạp gen GUS thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* chủng EHA101. Kết quả nghiên cứu thu được tỷ lệ tái sinh chồi của giống Thorne đạt 60%, Williams đạt 46%, Williams79 đạt 37% và Williams82 đạt 56%. So sánh với kết quả biến nạp gen GmNAC004 vào giống đậu tương ĐT22 đã thực hiện thì tỷ lệ mẫu phát sinh đa chồi đạt 64% mà nhóm nghiên cứu thu được khá khả quan. Kết quả biến nạp được thống kê chi tiết và đánh giá thông qua các thông số quan tâm được trình bày tại bảng 2, hình 2.

Bảng 2. Kết quả biến nạp gen chịu hạn *GmNAC004* vào giống đậu tương ĐT22

Thí nghiệm	Số lượng mẫu				Tỉ lệ mẫu đa chồi (%)	Tỉ lệ mẫu sống sót sau chọn lọc (%)	Số cây ra đất sống sót	Số cây sống sót sau khi phun basta
	CCM	SIM	SEM	RM				
1	320	130	115	18	40,63	13,85	17	15
2	230	163	148	19	70,87	11,66	15	11
3	300	247	151	9	82,33	3,64	8	3
4	430	286	155	7	66,51	2,45	0	0
5	240	180	143	9	75	5	6	3
6	300	290	145	13	96,67	4,48	10	8
7	300	100	83	2	33,33	2	1	0
8	170	150	122	1	88,24	0,67	0	0
9	280	142	119	2	50,71	1,41	0	0
10	300	150	72	6	50	4	6	4
Tổng số	2870	1838	1253	86	64,04	4,68	63	44

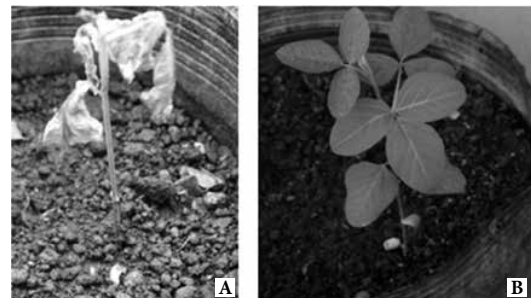
Ghi chú: CCM: Môi trường đồng nuôi cấy; SIM: Môi trường tạo đa chồi; SEM: Môi trường kéo dài chồi; RM: Môi trường ra rễ.



Hình 2. Quá trình chuyển gen *GmNAC004* vào giống đậu tương ĐT22 sử dụng vi khuẩn *A. tumefaciens* mang vector *pZY101::RD29A::GmNAC004*.

Nảy mầm hạt (A); Đồng nuôi cấy (B); Nhân chồi (C, D); Kéo dài chồi (E, F); Tạo rễ (G, H); Cây con ra đất (I).

Để giảm nhẹ những phần việc phân tích cây sau chuyển gen bằng kỹ thuật sinh học phân tử đồng thời loại bỏ được khả năng cây mang gen ở thể khảm, toàn bộ 63 cây chuyển gen T0 được nhóm nghiên cứu chọn lọc tiếp với thuốc diệt cỏ basta nồng độ 100 mg/l. Tiến hành phun kiểm tra cây con sau khi trồng trong bầu 2 tuần tuổi và được theo dõi 6 ngày sau khi phun basta 2 lần. Kết quả phun basta đã thu được 44 cây sống sót (Hình 3). Những cây sống sót sau chọn lọc với basta được tiếp tục dùng làm vật liệu cho thí nghiệm phân tích, đánh giá sự có mặt của gen chuyển bằng phương pháp phân tích sinh học phân tử.



Hình 3. Kết quả chọn lọc bằng basta sau 6 ngày của các cây đậu tương chuyển gen *GmNAC004* thể hệ T0 sử dụng vi khuẩn *A. tumefaciens* mang vector *pZY101::RD29A::GmNAC004*.

(A): Cây đậu tương ĐT22 không chuyển gen; (B): Cây chuyển gen T0.

3.2. Phân tích sự có mặt của gen chịu hạn *GmNAC004* trong genome của các dòng đậu tương chuyển gen

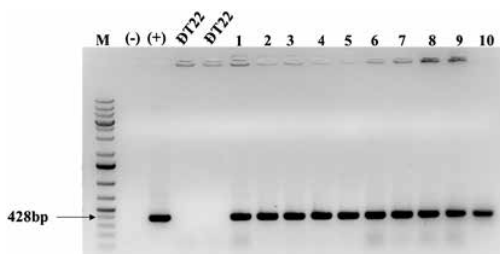
Tiến hành thu mẫu lá của 44 cây con chuyển gen

T0 sống sót sau khi phun basta để tách chiết ADN tổng số phục vụ cho các thí nghiệm phân tích PCR và Southern blot. Kết quả phân tích được trình bày trong bảng 3.

Bảng 3. Kết quả phân tích PCR các cây đậu tương chuyển gen *GmNAC004* thế hệ T0

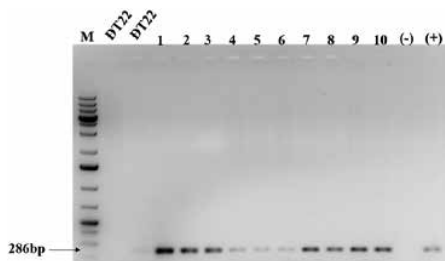
Số lượng mẫu biến nạp	Cây đậu tương chuyển gen T0 sống sót sau phun basta	Kết quả phân tích PCR dương tính			Hiệu suất chuyển gen (%)
		Gen <i>bar</i>	Promoter <i>RD29A</i>	Gen <i>GmNAC004</i>	
2870	44	44	44	8	0,28

Phân tích PCR sự có mặt gen *bar* bằng cặp mỗi BAR-F/ BAR-R, kết quả cho thấy: Đối chứng âm không cho băng, đối chứng dương cho băng nét và rõ ràng, cây không chuyển gen ĐT22 không cho băng, các cây chuyển gen cho băng có kích thước bằng với kích thước plasmid (428 bp). Toàn bộ 44 cây chuyển gen T0 đều dương tính với gen *bar* (Hình 4). Đồng thời, nhóm nghiên cứu cũng phân tích kiểm tra sự có mặt của promoter *RD29A* trong các cây chuyển gen T0 có kết quả PCR dương tính gen *bar* với cặp mỗi *RD29A-F/ RD29A-R*, kết quả cho thấy, các cây chuyển gen cho kích thước đoạn gen kiểm tra bằng với kích thước đoạn gen đối chứng dương và bằng với kích thước đoạn gen mong muốn (286 bp) (Hình 5).



Hình 4. Kết quả điện di sản phẩm PCR sử dụng cặp mỗi BAR-F/BAR- R.

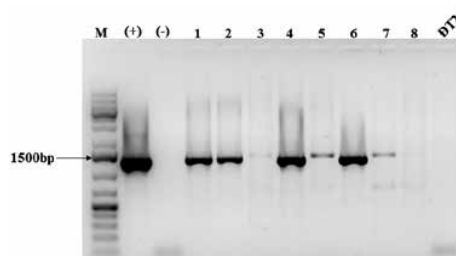
(M): Marker 1kb plus genuler; (-): H₂O; (+): Plasmid *RD29A-P/ GmNAC004*; (ĐT22): Cây không chuyển gen; (1-10): Cây chuyển gen T0.



Hình 5. Kết quả điện di sản phẩm PCR sử dụng cặp mỗi *RD29A-F/RD29A-R*.

(M): Marker 1kb plus genuler; (ĐT22): Cây không chuyển gen; (1-10): Cây chuyển gen T0; (-): H₂O; (+): Plasmid *RD29A-P/GmNAC004*.

Tiếp tục phân tích PCR sự có mặt của gen *GmNAC004* bằng cặp mỗi *CdsNAC04-F/ RB-R* trong các cây chuyển gen T0 có kết quả PCR gen *bar* và promoter *RD29A* dương tính, kết quả thu được 8 cây dương tính với gen quan tâm đạt hiệu suất chuyển gen 0,28%. Các băng thu nhận được có kích thước bằng với kích thước đối chứng dương plasmid *pRD29A::GmNACs* (1500 bp). Đối chứng âm nước và ĐT22 không xuất hiện băng chứng tỏ phản ứng không bị nhiễm và cặp mỗi sử dụng đặc hiệu không xuất hiện băng nội sinh (Hình 6).



Hình 6. Kết quả điện di sản phẩm PCR sử dụng cặp mỗi *CdsNAC04-F/RB-R*.

(M): Marker 1kb plus genuler; (+): Plasmid *pRD29A:: GmNACs*; (-): H₂O; (1-8): Cây chuyển gen *GmNAC004*; (ĐT22): Cây không chuyển gen.

Với kết quả này, đã tiến hành gieo trồng hạt T1 của 8 dòng T0 dương tính PCR để sàng lọc bằng phương pháp phun thuốc diệt cỏ basta nhằm lựa chọn những dòng đậu tương đồng hợp tử cho các thí nghiệm đánh giá tiếp theo ngoài đồng ruộng. Kết quả ban đầu cho thấy cả 8 dòng đều có sự phân ly về kiểu gen. Thí nghiệm phân tích đánh giá sự có mặt của gen chuyển cũng như sàng lọc để tìm ra dòng chuyển gen đồng hợp tử vẫn đang được nhóm nghiên cứu tiến hành trong các thế hệ kế tiếp.

IV. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

4.1. Kết luận

Kết quả nghiên cứu biến nạp gen *GmNAC004* vào giống đậu tương ĐT22 thông qua chủng

khuẩn *A. tumefaciens* EHA101 mang vector *pZY101::RD29A::GmNAC004* đã thu được 63 cây đậu tương chuyển gen thể hệ T0 sống sót sau quá trình chọn lọc và ra đất. Sau khi sàng lọc bằng phun basta, thu được 44 cây sống sót với phun basta. Kết quả phân tích sinh học phân tử đã xác định được 8 dòng có kết quả PCR dương tính với gen đích ở thể hệ T0 với hiệu suất chuyển gen đạt 0,28%.

4.2. Đề nghị

Tiếp tục thực hiện các thí nghiệm phân tích sinh học phân tử, chọn lọc dòng chuyển gen đồng hợp để tiến tới đánh giá khả năng chịu hạn ở các thể hệ tiếp theo của 8 dòng chuyển gen thu được.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu này được hỗ trợ kinh phí từ Chương trình Khoa học và Công nghệ Độc lập cấp Nhà nước của Bộ Khoa học và Công nghệ theo Hợp đồng số 03/2012/HĐ-ĐTĐL.

Research of GMNAC004 gene transfer into DT22 soybean lines using *Agrobacterium*

Nguyen Van Dong, Nguyen Anh Vu,
Le Thi Mai Huong, Nguyen Trung Anh

Abstract

Recent studies have confirmed that GmNAC004 is one of the genes in the NAC gene family that involves in drought tolerance in soybean. In this study, the GmNAC004 gene was used to transform 2870 half-seed explants of the DT22 soybean cultivar through *Agrobacterium tumefaciens* vector bearing *pZY101::RD29A::GmNAC004*. Molecular analysis showed that eight herbicide tolerant lines were also positive for PCR analysis. The results also confirmed that GmNAC004 gene was successfully transformed into Vietnamese soybean variety with a rate of 0.28%.

Key words: *Agrobacterium tumefaciens*, soybean (*Glycine max* (L.) Merr), transformation, *GmNAC004*

Ngày nhận bài: 14/3/2017

Người phản biện: TS. Phạm Thị Lý Thu

Ngày phản biện: 20/3/2017

Ngày duyệt đăng: 24/3/2017

PHÁT HIỆN MỘT SỐ ĐỘT BIẾN ĐIỂM TRÊN VÙNG MÃ HÓA CỦA GEN BGIOGA024502 (Ghd7) Ở DÒNG LÚA ĐỘT BIẾN BẰNG CHÙM ION

Nguyễn Thị Hồng¹, Võ Thị Minh Tuyền¹,
Yoshikazu Tanaka², Lê Huy Hàm¹

TÓM TẮT

Nhiều công bố chỉ ra rằng chùm ion (ion beam) là tác nhân tạo ra nhiều đột biến điểm có ý nghĩa trong chọn giống cây trồng. Thông qua BLAST cơ sở dữ liệu của gen BGIOGA024502 (Ghd7) đã được khai thác với trình tự đã được giải mã hoàn chỉnh. Dựa trên dữ liệu thu được, bốn mối đột biến được thiết kế nhằm khuếch đại gen BGIOGA024502 và giải trình tự vùng mã hóa của dòng đột biến. Tổng số 1548 trình tự mã hóa cho gen BGIOGA024502 (Ghd7) (774 trình tự của dòng đột biến và 774 trình tự của dòng gốc) đã được đọc trình tự theo phương pháp Sanger. Bốn đột biến điểm được xác định bao gồm, hai trình tự tại vị trí 332 và 336 trên vùng mã hóa 1 (exon1) và hai trình tự tại vị trí 72 và 253 trên vùng mã hóa 2 (exon2). Dựa trên các đột biến này, hai chỉ thị phân tử mới đã được phát triển nhằm nâng cao hiệu quả của chọn giống lúa đột biến.

Từ khóa: BGIOGA024502, Ghd7, bức xạ ion, đột biến điểm, giải trình tự, chọn giống đột biến

¹ Viện Di truyền Nông nghiệp, Phạm Văn Đồng, Bắc Từ Liêm, Hà Nội, Việt Nam

² Trung tâm Nghiên cứu Năng lượng Wakasa-wan, Fukui, Nhật Bản