

THIẾT KẾ CẤU TRÚC CRISPR/CAS9 TẠO ĐỘT BIẾN GEN *ADH* TRÊN CÀ CHUA

Lê Thị Hoa¹, Nguyễn Thị Lan Hoa¹, Đồng Huy Giới²,
Nguyễn Thị Thanh Thủy³, Roland Schafleitner⁴

TÓM TẮT

Hệ thống CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat) Cas9 là một công nghệ mới trong lĩnh vực chỉnh sửa hệ gen. Nghiên cứu này đã thiết kế được hai guideRNA (gRNA) bổ sung với trình tự exon 2 và exon 4 của lần lượt 2 gen đích *Alcohol dehydrogenase ADH2-4* và *ADH2-6* và biến nạp các đoạn này vào vector pKSE401. pKSE401 là vector có mang hệ thống CRISPR/Cas9 cảm ứng gây đột biến ở thực vật. Hai vector được thiết kế lại với các đoạn gRNA mới được đặt tên pKSE401-ADH2-4 và pKSE401-ADH2-6 đã được biến nạp thành công vào chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* GV3101. Các vector này được chuẩn bị sẵn sàng cho các công tác biến nạp vào cà chua ở các bước tiếp theo.

Từ khóa: gRNA, CRISPR/Cas9, *alcohol dehydrogenase*, cà chua

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Công nghệ chỉnh sửa gen ngày nay được coi là tương lai của cây trồng thế hệ mới. Năm 2011, Lusser và cộng sự đã công bố nghiên cứu về một kỹ thuật mới gây đột biến tại vị trí xác định - CRISPR/Cas9 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeat-Cas9) với bộ máy hoạt động tối giản hơn và đem lại hiệu quả cao hơn (Cong *et al.*, 2013; Mali *et al.*, 2013). Với công cụ mới này, cho đến nay nhiều loại cây trồng đã được thử nghiệm để tạo đột biến có chủ đích như lúa gạo (Li *et al.* 2012), khoai tây (Sawai *et al.*, 2014), cà chua (Lor *et al.*, 2014). Ứng dụng kỹ thuật CRISPR/Cas9 cải tiến hệ gen cà chua hứa hẹn sẽ là một hướng đi đầy tiềm năng, tiết kiệm đáng kể thời gian và công sức để chọn tạo giống đột biến mới dựa trên cơ sở chỉnh sửa những đặc điểm tính trạng chưa hoàn hảo của thế hệ giống trước.

Nghiên cứu này đã lựa chọn gen đích *Alcohol dehydrogenase (ADH)*, là một họ gen lớn và có vai trò quan trọng trong nhiều loài sinh vật để thiết kế gRNA cho vector CRISPR/Cas9 chỉnh sửa gen này. Hai gen thuộc họ gen *ADH* nằm tại nhiễm sắc thể số 4 và nhiễm sắc thể số 6, có chức năng bổ sung cho nhau. Vì vậy, khi CRISPR/Cas9 gây ra những thay đổi trên gen làm biến mất chức năng thì cũng không ảnh hưởng đến sự sinh tồn của cây (Christopher *et al.*, 2014).

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

- Thông tin trình tự gen *ADH* truy xuất từ cơ sở dữ liệu hệ gen cà chua:

Gen *ADH2-6*: <https://solgenomics.net/feature/17847465/details>

Gen *ADH2-4*: <https://solgenomics.net/feature/17800027/details>

- Vector pKSE401 (Qi-Jun Chen, 2014) và dòng vi khuẩn *A. tumefaciens* (GV3101::pMP90) được cung cấp bởi Addgene. Co.

- Các enzyme giới hạn do công ty NEB cung cấp, các oligo nucleotide do công ty Yourgene, Đài Loan tổng hợp.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thiết kế gRNA

- Chương trình Cas9 Designer (<http://cas9.cbi.pku.edu.cn>) được sử dụng để thiết kế gRNA (Ma *et al.*, 2013).

- Các cặp môi đặc hiệu khuếch đại vùng gen đích có chứa vị trí tương ứng với gRNA được thiết kế bằng phần mềm Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>).

2.2.2. Thiết kế vector tái tổ hợp CRISPR cas9

Đoạn gRNA được biến nạp vào vector pKSE401 bằng phương pháp Golden Gate assembly (Engler *et al.*, 2014) với enzyme BsaI (10U/μl): Vector pKSE401 được cắt mở vòng bởi enzyme BsaI (10U/μl) hoạt động ở nhiệt độ 37°C khoảng 1.5~2h. Tạo vector tái tổ hợp bằng phản ứng nối với thành phần phản ứng: 5 μl nước cất, 2.5 μl đoạn chèn DNA, 1 μl vector đã mở vòng, T4 DNA ligase 0.5 μl và 1X buffer được ủ qua đêm ở điều kiện 4°C. Kiểm tra vector tái tổ hợp mang gRNA bằng cặp môi đặc hiệu *ADH2-4/6F/R* cho phản ứng PCR với thành phần: 1x buffer, 0.25mM dNTP, 20mM môi, 0.5 unit Taq và 25ng DNA plasmid, với chu trình nhiệt: biến tính ở 94°C -4 phút, 35 chu trình: 94°C -35 giây, 55°C -35 giây, 72°C -1 phút, tổng hợp tiếp ở 72°C trong

¹ Trung tâm Tài nguyên thực vật; ² Học viện Nông nghiệp Việt Nam

³ Bộ Nông nghiệp và phát triển nông thôn; ⁴ Trung tâm Rau màu Thế giới

5 phút, bảo quản tại 4°C. Sản phẩm PCR được điện di trên gel agarose 1% với ladder 1kb của Fermentas điều kiện 100V trong 30 - 40 phút.

2.2.3. Biến nạp vector tái tổ hợp CRISPR/Cas9 vào vi khuẩn *A. tumefaciens*

Vector tái tổ hợp bằng vi khuẩn *E. coli*. Tách DNA plasmid sử dụng kit mini plus Plasmid DNA extraction system MacroGen đảm bảo nồng độ DNA đủ lớn để tiến hành biến nạp. Chuyển plasmid DNA vào *Agrobacterium tumefaciens* bằng phương pháp sốc nhiệt (Van Eck *et al.*, 2007).

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Thiết kế gRNA đặc hiệu cho 2 gen mục tiêu *ADH2-4* và *ADH2-6*

Nghiên cứu này sử dụng chương trình Cas9 Designer (<http://cas9.cbi.pku.edu.cn>) do Ma và cộng sự phát triển (Ma *et al.*, 2013). Chương trình cho phép xác định trực tiếp gRNA bằng cách đưa vào các trình tự gen đích với các tiêu chí lựa chọn chính: Tính duy nhất, vị trí trên gen, tỷ lệ GC và ưu tiên có vị trí cắt enzyme. Kết quả cho ra nhiều gRNA có vị trí tương ứng nằm trên gen đích và đã tối ưu theo các điều

kiện chọn lọc. Trong nghiên cứu này, trình tự đưa vào chương trình Cas9 Designer là các vùng exon 2 của gen *ADH2-4* (*Solyc04g064710.2.1*) và exon 4 của gen *ADH2-6* (exon: *Solyc06g059740.2.1.10*). Đây là các vùng exon có trình tự mã hóa protein lớn nhất trên các gen.

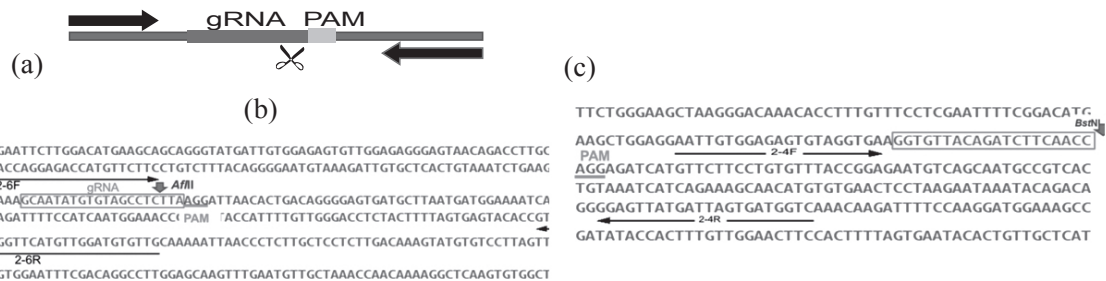
Với các điều kiện chọn lọc như: Tính duy nhất trong hệ gen và tỉ lệ AT trong trình tự (~50-60%), chương trình Cas9 Designer đưa ra 5 và 3 trình tự gRNA phù hợp cho lần lượt hai gen *ADH2-4* và *ADH2-6*. Trong số đó, những đoạn gRNA ở phía đầu của exon nhất được tiếp tục lựa chọn để có khả năng tác động lớn nhất vào gen. Để quá trình sàng lọc đột biến được thuận lợi, gRNA cần có thêm các đặc điểm ưu tiên: có vị trí nhận biết của một enzyme cắt giới hạn và nằm gần trình tự PAM. Để phục vụ việc biến nạp gRNA vào vector pKSE401, gRNA được thiết kế là sợi oligo kép, có 2 đầu so le bổ sung với vị trí cắt enzyme giới hạn tương ứng là *BsaI* trên vector pKSE401. Vị trí enzyme cắt có trình tự bờ trái và bờ phải lần lượt là TAAC và TTTG. Thực hiện tương tự với cả 2 gen *ADH*, gRNA sợi kép được thiết kế với các enzyme cắt giới hạn tương ứng được thống kê trong bảng 1.

Bảng 1. Trình tự gRNA được thiết kế cho gen *ADH2-4* và *ADH2-6*

Gen	Oligo sợi kép gRNA	AT (%)	Vị trí trong hệ gen và trong gen	Enzym
<i>ADH2-4</i>	5' ATTGGGTGTTACAGATCTTCAACC3' 5' AAACGGTTGAAGATCTGTAACACC3'	60	SL2.50ch04:55859796-55859815(+) 	<i>BstNI</i>
<i>ADH2-6</i>	5' ATTGGCAATATGTGTAGCCTCTTA3' 5' AAAC TAAGAGGCTACACATATTGC3'	60	SL2.40ch06:33997297-33997316(+) 	<i>AflII</i>

Để khuếch đại vùng gen đích có chứa vị trí tương ứng với gRNA trên vector biến nạp phục vụ việc kiểm tra hiệu quả biến nạp và khảo sát các đột biến tạo bởi hệ thống CRISPR/Cas9 ở cả chua sau này bằng phản ứng PCR, hai môi đặc hiệu *ADH2-4* và *ADH2-6* đã được thiết kế sử dụng phần mềm Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>). Trong trường

hợp có đột biến thêm hoặc mất đoạn, các băng sẽ có kích thước khác nhau khi kiểm tra sản phẩm PCR trên gel acrylamid 6%. Các cặp môi này được thiết kế đặc hiệu khuếch đại vùng có chứa gRNA, PAM trên vector và cả trong cấu trúc được đưa vào cả chua sau này (Hình 1, Bảng 2).



Hình 1. Thiết kế môi (a), môi PCR đặc hiệu trên gen *ADH2-6* (b) và gen *ADH2-4* (c)

Bảng 2. Cặp mỗi đặc hiệu khuếch đại vùng gen đích

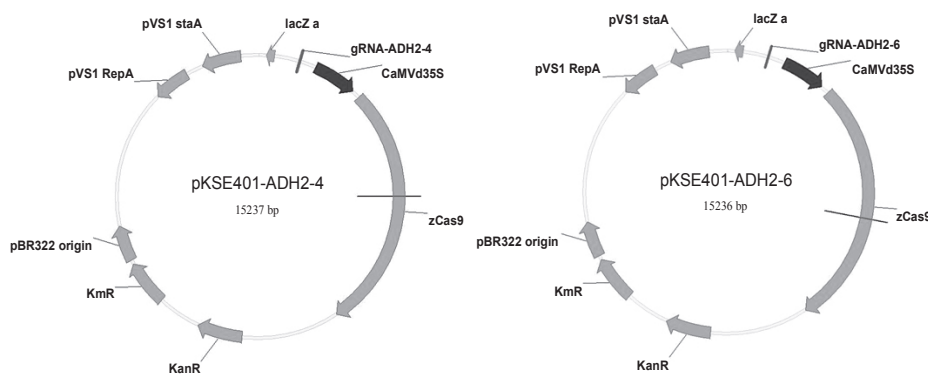
Mỗi	Trình tự	%GC	Ta	Kích thước
ADH2-4F	AAT TGT GGA GAG TGT AGG TGA	50%	60°C	170bp
ADH2-4R	CCA TCA CTA ATC ATA ACT CC	48%		
ADH2-6F	ACC AGG AGA CCA TGT TCT TC	52%	60°C	224bp
ADH2-6R	ACA CAT CCA ACA TGA ACC AC	50%		

Sau khi hoàn thành thiết kế và lựa chọn gRNA cùng với mỗi PCR, enzyme cắt giới hạn, thí nghiệm tiếp theo được tiến hành: biến nạp gRNA vào vector có chứa sẵn trình tự mã hóa enzyme Cas9.

3.2. Thiết kế vector tái tổ hợp CRISPR/Cas9 và biến nạp vector tái tổ hợp chứa hệ thống CRISPR/Cas9 vào vi khuẩn *A. tumefaciens* (GV3101::pMP90)

Vector pKSE401 được thiết kế bởi Xing-Jun Chen và cộng sự (2014) dựa trên khung pCAMBIA. Vector này có chứa 2 hệ thống biểu hiện đặc hiệu promoter U6-26 điều khiển biểu hiện gRNA và promoter CaMV 35S điều khiển biểu hiện của cas9 (Xing *et al.*, 2014). Ở thực vật, promoter EF1A, CMV, UBO

đã được nhiều nghiên cứu sử dụng để điều khiển enzyme cas9 và promoter RNA III U26 biểu hiện cho gRNA (Khaoula *et al.*, 2013). Vector pKSE401 có vị trí nhận diện enzyme cắt giới hạn BsaI. Ưu điểm của việc sử dụng enzyme BsaI là enzyme có giá tương đối thấp so với các enzyme khác, chỉ bằng 1/50 giá của enzyme AarI, giúp mở vector pKSE401 có thể biến nạp một hay nhiều gRNA, nhưng như các enzyme khác trong phương pháp golden gate, enzyme này cắt ADN ở ngoài vùng các nu nhận dạng, tạo đầu so le, và thông thường sản phẩm cuối cùng sau khi clone lại không còn vị trí nhận diện cắt của enzyme, khó mà cắt lại được lần nữa bằng chính enzyme đó.



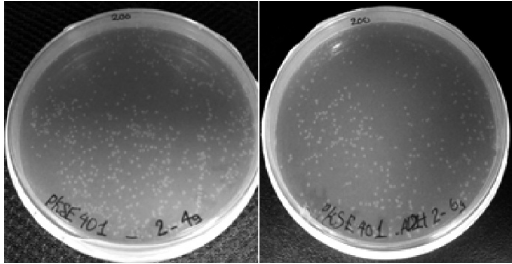
Hình 2. Vector pKSE401-ADH2-4 và pKSE401-ADH2-6 mang gRNA được thiết kế từ exon 2 của gen ADH2-4 và exon 4 của gen ADH2-6

Để biến nạp gRNA vào vector pKSE401, gRNA được thiết kế là sợi oligo kép, có 2 đầu so le bổ sung với vị trí cắt của enzyme BsaI trên vector pKSE401. Các đoạn gRNA được biến nạp vào vector pKSE401 bằng phương pháp Golden Gate (Engler *et al.*, 2014). Enzyme BsaI cắt rời plasmid 1 đoạn khoảng 1200 nu để hở ra 2 đầu so le có trình tự bờ trái và bờ phải lần lượt là TAAC và TTTG. Các đoạn gRNA được nối vào điểm cắt so le này bằng enzyme nối ligase với tỉ lệ 3:1 (3 gRNA /1vector). Biến nạp gRNA vào vector pKSE chính là thay thế đoạn trình tự hơn 1000bp bằng gRNA có kích thước hơn 20bp. Kết quả biến nạp thu được 2 vector pKSE401-ADH2-4 và pKSE401-ADH2-6 mang gRNA được thiết kế từ exon 2 của gen ADH2-4 và exon 4 của gen ADH2-6

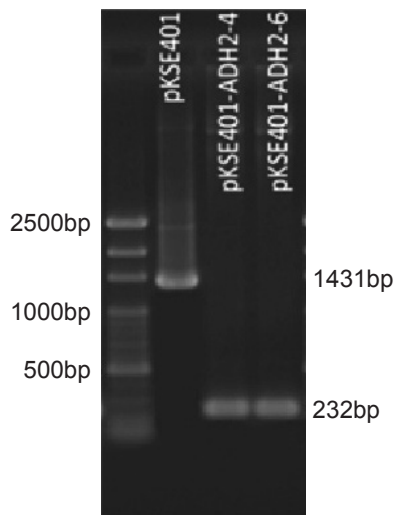
cùng cấu trúc cas9 tích hợp sẵn trong khung vector pKSE401 ban đầu (Hình 2).

Sau khi xây dựng thành công vector tái tổ hợp pKSE401-ADH mang gRNA, plasmid được biến nạp vào vi khuẩn *A. tumefaciens* GV3101 bằng kỹ thuật sốc nhiệt (Van Eck *et al.*, 2007). Vi khuẩn *A. tumefaciens* biến nạp được nuôi cấy trên môi trường YEP đặc bổ sung thêm kháng sinh chọn lọc kanamycin 50mg/l. Sau 48h nuôi cấy trong điều kiện 28°C, những khuẩn lạc tốt, phát triển đồng đều được chuyển sang môi trường YEP lỏng bổ sung kháng sinh kanamycine nuôi cấy để thu sinh khối, tách plasmid (Hình 3). Kiểm tra sự có mặt của gRNA trên các plasmid pKSE401-ADH2-4 và pKSE401-ADH2-6 bằng phản ứng PCR sử dụng cặp mỗi đặc hiệu 401F/401R,

điện di kiểm tra kích thước trên gel agarose cho thấy sản phẩm khuếch đại đã có kích thước nhỏ đi (~232bp) so với kích thước ban đầu của đối chứng là plasmid pKSE401 (1431bp), chứng tỏ đoạn chèn đã thay thế thành công phần cắt của enzyme BsaI và các plasmid này đã được biến nạp thành công vào vi khuẩn *A. tumefaciens* (Hình 4). Các dòng vi khuẩn *A. tumefaciens* biến nạp thành công này được lưu giữ để tiếp tục biến nạp với cà chua để kiểm tra khả năng gây đột biến trong các gen ADH.



Hình 3. *A. tumefaciens* mang CRISPR/Cas9



Hình 4. Kết quả kiểm tra plasmid sau khi biến nạp

IV. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. Kết luận

Nghiên cứu đã thiết kế gRNA và tạo được 2 vector tái tổ hợp pKSE401-ADH2-4 và pKSE401-ADH2-6 mang cấu trúc CRISPR/Cas9 cho hai ADH2-4 và ADH2-6. Các plasmid đã được biến nạp thành công vào dòng vi khuẩn *A. tumefaciens* GV3101.

4.2. Đề nghị

Tiếp tục biến nạp các cấu trúc CRISPR/Cas9 để đánh giá khả năng gây đột biến trên gen *Alcohol dehydrogenase* ở cà chua thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Christopher Brooks, Vladimir Nekrasov, Zachary B. Lippman and Joyce Van Eck**, 2014. Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated9 system. *Plant physiology* 166(3): 1292-1297.
- Cong, Le Ran, F. Ann Cox, David Lin, Shuailiang Barretto, Robert Habib, Naomi Hsu, Patrick D. Wu, Xuebing Jiang, WenyanMarraffini, Luciano A.**, 2013. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339(6121): 819-823.
- Engler, Carola Youles, Mark Gruetzner, Ramona Ehnert, Tim-Martin Werner, Stefan Jones, Jonathan D. G. Patron, Nicola J. Marillonnet, Sylvestre**, 2014. A golden gate modular cloning toolbox for plants. *ACS synthetic biology*, 3(11): 839-843.
- Khaoula Belhaj, Angela Chaparro-Garcia, Sophien Kamoun and Vladimir Nekrasov**, 2013. Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. *Plant methods*, 9(1): 1
- Li, Ting, Liu, Bo Spalding, Martin H. Weeks, Donald P. Yang, Bing**, 2012. High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. *Nature biotechnology*, 30(5): 390-392.
- Ma, Ming Ye, Adam Y. Zheng, Weiguo Kong, Lei**, 2013. A guide RNA sequence design platform for the CRISPR/Cas9 system for model organism genomes. *BioMed Research International* 2013.
- Mali, Prashant Yang, Luhan Esvelt, Kevin M. Aach, John Guell, Marc DiCarlo, James E. Norville, Julie E. Church, George M.**, 2013. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 339(6121): 823-826.
- Sawai, S. Ohyama, K. Yasumoto, S. Seki, H. Sakuma, T. Yamamoto, T. Takebayashi, Y. Kojima, M. Sakakibara, H. Aoki, Toshio**, 2014. Sterol side chain reductase 2 is a key enzyme in the biosynthesis of cholesterol, the common precursor of toxic steroidal glycoalkaloids in potato. *The Plant Cell*, 26(9): 3763-3774.
- Van Eck, J. Conlin, B. Garvin, D. F. Mason, Hugh Navarre, D. A. Brown**, 2007. Enhancing beta-carotene content in potato by RNAi-mediated silencing of the beta-carotene hydroxylase gene. *American Journal of Potato Research*, 84(4): 331-342.
- Xing, Hui-Li Dong, Li Wang, Zhi-Ping Zhang, Hai-Yan Han, Chun-Yan Liu, Bing Wang, Xue-Chen Chen, Qi-Jun**, 2014. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC plant biology*, 14(1): 1.

Construction of gene targeting CRISPR/Cas9 vector for genetic mutation inducing on tomato *ADH* genes

Le Thi Hoa, Nguyen Thi Lan Hoa, Dong Huy Gioi,
Nguyen Thi Thanh Thuy, Roland Schaffleitner

Abstract

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat) cas9 system is a novel technique for genome editing. In this study, two guideRNA (gRNA) sequences targeted in two exon 2 and exon 4 of *alcohol dehydrogenase ADH2-4* and *ADH2-6* genes, respectively, were reconstructed into vector pKSE401 carrying Cas9-expression cassette. Two reconstructed plasmids *pKSE401-ADH2-4* and *pKSE401-ADH2-6* were also successfully cloned in *A. tumefaciens* strain GV3101. These systems are in handy for the next step of transformation to tomato explants.

Key words: gRNA, CRISPR/Cas9, *alcohol dehydrogenase*, tomato

Ngày nhận bài: 12/11/2016

Ngày phản biện: 17/11/2016

Người phản biện: TS. Trần Danh Sừu

Ngày duyệt đăng: 21/11/2016

NGHIÊN CỨU ĐA DẠNG HÀM LƯỢNG AMYLOSE VÀ MỘT SỐ TÍNH TRẠNG CHÍNH CỦA TẬP ĐOÀN LÚA CAO SẢN VÀ LÚA MÙA

Hồ Văn Được¹, Nguyễn Thị Lang¹, Trần Thị Thanh Xà²,
Nguyễn Thị Thảo Nguyên³, Bùi Chí Bửu³

TÓM TẮT

Việc chọn lọc cây bố mẹ là một trong những bước đầu quan trọng và quyết định đến sự thành công của phương pháp lai tạo ra giống lúa mới. Do đó, đề tài được thực hiện nhằm đánh giá mức độ đa dạng giữa 70 giống lúa cao sản và 88 giống lúa mùa trong ngân hàng gen của Viện Lúa Đồng Bằng sông Cửu Long bằng phương pháp đánh giá hình thái và các phương pháp sinh hóa (hàm lượng amylose và đặc tính nông học). Kết quả cho thấy 70 giống lúa cao sản được chia thành 3 nhóm: nhóm I (có TGST <90 ngày), nhóm II (có TGST từ 90-100 ngày), nhóm III (có TGST >100 ngày). Bên cạnh đó, nhóm lúa mùa cũng được chia thành 3 nhóm: nhóm I (có TGST từ 98-114 ngày), nhóm II (có TGST từ 115-127 ngày), nhóm III (có TGST từ 128-136 ngày). Tuy nhiên, hàm lượng amylose của các giống lúa trong cùng nhóm cũng tương đối khác nhau.

Từ khóa: Cây lúa, lúa mùa, lúa cao sản, tính trạng hàm lượng amylose, đa dạng di truyền.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Theo Vaughan (1994) thì chi *Oryza* có 22 loài, tuy nhiên, chỉ có *O. sativa* và *O. glaberrima* được sử dụng trong canh tác. Hiện nay, loài *O. glaberrima* chỉ được trồng ở một số quốc gia Tây Phi và đang được thay thế dần bởi *O. sativa* (De Datta, 1981). Theo đặc tính sinh lý, nói chung, lúa là cây ngày ngắn, là loại thực vật chỉ cảm ứng ra hoa và kết hạt trong cả điều kiện ngày ngắn và ngày dài, chỉ một số giống phản ứng chặt với ánh sáng ngày ngắn), việc xử lý ngày dài có thể ngăn chặn hoặc trì hoãn sự ra hoa (Vergara and Cheng, 1985). Tuy nhiên, phản ứng đối với quang kỳ thay đổi tùy theo giống lúa. Dựa vào mức độ cảm ứng đối với quang kỳ, người ta chia thành hai nhóm lúa chính là nhóm cảm quang và nhóm không cảm quang (Nguyễn Ngọc Đệ, 2008). Dựa vào thời gian sinh trưởng, các giống lúa ở hai nhóm này lại được

chia thành các nhóm nhỏ hơn. Nghiên cứu đa dạng di truyền tính trạng hàm lượng amylose cũng là cơ sở khoa học chọn ra các cặp bố mẹ phù hợp để tạo ưu thế lai phục vụ cho việc chọn, tạo giống lúa chất lượng cao. Do đó, đề tài được thực hiện nhằm đánh giá sự đa dạng di truyền của các giống lúa cao sản và lúa mùa trong ngân hàng gen của Viện Lúa Đồng Bằng Sông Cửu Long để chọn lựa thể hệ bố mẹ phục vụ cho công tác lai tạo giống mới.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Bộ giống lúa gồm 70 giống lúa cao sản và 88 giống lúa mùa từ Viện Lúa Đồng Bằng Sông Cửu Long (Bảng 1) và 4 giống đối chứng IR50404, IR64, Jasmine 85, Nếp OM7348.

¹ Trường Đại học Cần Thơ; ² Viện Lúa Đồng bằng sông Cửu Long

³ Viện Khoa học kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam