

## NGHIÊN CỨU CHUYÊN GEN KHÁNG SÂU VÀO PHÔI HỢP TỬ CHƯA TRƯỞNG THÀNH CỦA CÁC DÒNG NGÔ LAI F1

Phạm Thị Lý Thu, Nguyễn Thị Hòa,  
Phạm Thị Hương, Lê Thị Lan,  
Nguyễn Văn Đồng, Lê Huy Hàm

### SUMMARY

#### Studies on insect resistance gen transfer into immature zygotic embryos of F1 hybrid maize lines

Studies on selection and commercialization of transgenic *Bt* crops in general and transgenic *Bt* maize in particular were relatively strong grown in the last few years. However, in Vietnam, the study of transgenic maize met many difficulties due to unidentified source material - the lines / varieties have the ability to regenerate and grow well in nature. In this study, we used immature embryos from three F1 hybrid maize lines (which were the hybrid forms of model lines HR9/HR8 and selected line CM8) as source materials of transformation process. The results showed that the use of those hybrid maize lines were more efficient than model lines HR9/HR8 and selected line CM8 in the transformation of insect resistant gen *Cry1A(c)* through *Agrobacterium tumefaciens*. Based on the results of PCR analysis, we had received 27 lines carrying *Cry1A(c)* gene, 55 lines carrying selectable marker *pmi* gene, 9 lines carrying both genes in the first generation (T0). Among three hybrid maize lines (HC9, CH9, HC8), HC8 hybrid line had capacity to receive insect resistant gen *Cry1A(c)* with the highest transformation efficiency (1.41%). In other hand, the T0 transgenic maize lines grew and adapted better than model maize line in nature. The hybrid maize lines carrying *Cry1A(c)* gen would be suitable materials for developing transgenic maize with insect resistance in Vietnam.

**Keywords:** *Agrobacterium tumefaciens*, maize (*Zea mays* L), transformation, *Cry1A(c)*, immature embryos.

### I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngô là cây trồng chủ lực của Việt Nam, đứng thứ hai sau cây lúa, xét về diện tích đất trồng. Tuy nhiên hiện nay nước ta liên tục phải nhập khẩu ngô theo chiều hướng năm sau cao hơn năm trước. Trong năm 2012, có hơn 1,6 triệu tấn ngô được nhập khẩu, tăng hơn 66% so với năm 2011. Mặc dù diện tích canh tác ngô lớn, với trên 1,1 triệu hecta, nhưng sản lượng chỉ đạt 4,4 triệu tấn. Một trong những nguyên nhân làm giảm năng suất ngô là do sâu bệnh hại ngày càng gia tăng và diễn biến phức tạp. 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, những kỹ thuật tiên tiến trong bảo vệ cây trồng nhằm xây dựng một nền nông nghiệp sạch, bền vững đang được áp dụng. Việc tạo ra các giống cây trồng biến đổi gen (Genetically Modified Crops, GMCs) có khả năng kháng sâu bệnh và côn trùng nhờ kỹ thuật di truyền đang được quan tâm nghiên cứu và ứng dụng vào thực tiễn nhằm nâng cao năng suất cây trồng, đem lại lợi ích tối đa cho nền nông nghiệp (Hellmich *et al.*, 2008).

*Bacillus thuringiensis* (*Bt*) là loại vi khuẩn đất, phần lớn các độc tố sinh ra của *B. thuringiensis* có khả năng gây độc cao đối với côn trùng. Các gen *Bt* (có nguồn gốc từ *B. thuringiensis*) được ứng dụng và chuyển

gen thành công ở cây ngô bao gồm gen *Cry1Ab*, *Cry1A(c)*, *Cry1Af*, *Cry2A*, *Cry3Bb1*, *Cry34Ab1*, *Cry35Ab1* (Amstrong *et al.*, 1995; Wiliam *et al.*, 1997; Giao *et al.*, 2004; Catanguì *et al.*, 2006; Siebert *et al.*, 2008; Zurbrugg *et al.*, 2009). Khả năng biểu hiện của các gen *cry* ở cây ngô chuyển gen đã được đánh giá trong phòng thí nghiệm và thử nghiệm ngoài đồng ruộng. Kết quả cho thấy các giống ngô mang gen *Bt* có khả năng kháng cao đối với sâu đục thân và trong quá trình canh tác không cần sử dụng bất kỳ biện pháp phòng trừ nào, đảm bảo năng suất thu hoạch của giống.

Nhìn chung, chuyển gen vào cây ngô còn gặp khó khăn do chưa xác định được nguồn vật liệu là các dòng/ giống ngô chọn lọc có khả năng tiếp nhận gen ngoại lai tốt, trong khi đó các dòng ngô mô hình nhập nội có khả năng tiếp nhận gen cao nhưng lại thích ứng kém trong điều kiện Việt Nam. Vì vậy, nghiên cứu này được tiến hành với mục đích khảo sát và đánh giá khả năng tiếp nhận gen kháng sâu *cry1A(c)* của các dòng ngô lai giữa dòng mô hình HR8/HR9 và dòng ngô chọn lọc CM8, nhằm khai thác các ưu điểm của các dòng ngô trong việc tạo ra các dòng ngô chuyển gen kháng sâu.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Vật liệu nghiên cứu

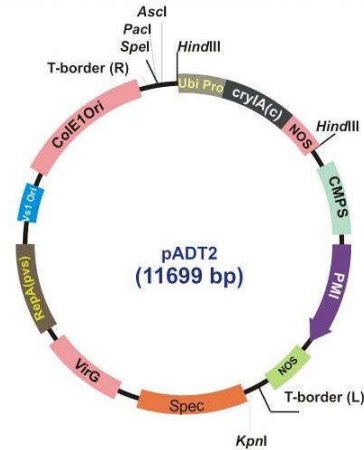
- Vật liệu thực vật

Các cây ngô mẹ cho vật liệu phối hợp từ chưa trưởng thành (phôi non) của các dòng lai F1 giữa dòng HR8/HR9 với dòng ngô Việt Nam: CH9 (CM8 × HR9), HC9 (HR9 × CM8), HC8 (HR8 × CM8). Các dòng ngô này được trồng tại Trại thí

nghiệm của Viện Di truyền Nông nghiệp tại Văn Giang, Hưng Yên.

- Vật liệu di truyền

Chủng vi khuẩn *A.tumefaciens* EHA105 mang vector pADT2 chứa gen kháng sâu *cry1A(c)* được điều khiển bởi đoạn khởi động Ubiquitin và gen chỉ thị chọn lọc *pmi* - chuyển hóa mannose (hình 1).



Hình 1: Sơ đồ cấu trúc vector pADT2

### 2. Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp chuyển gen vào phôi hợp tử chưa trưởng thành (phôi non) thông qua *A. tumefaciens*:

Phôi non được tách từ các bắp ngô ở giai đoạn 15 - 18 ngày sau thụ phấn. Phôi non sau khi tách được lấy nhiễm và đồng nuôi cấy với vi khuẩn *A. tumefaciens* theo quy trình của Phạm Thị Lý Thu (2007).

Phân tích cây chuyển gen:

**Tách DNA tổng số:** DNA tổng số được tách từ mẫu lá của các cây ngô chuyển gen tái sinh theo phương pháp CTAB (Saghai-Marooof *et al.*, 1984) có cải tiến.

**Phân tích PCR:** Phân tích PCR tiến hành với cặp môi PMI-1/PMI-2 đặc hiệu cho gen mã hóa enzyme phosphate mannose isomerase (*pmi*) và cặp môi S-cryIA(c)-F1/S-cryIA(c)-R1 đặc hiệu cho

gen *cryIA(c)*; thành phần PCR được bổ sung betaine và DMSO để tăng độ nhạy.

Bảng 1. Trình tự mỗi sử dụng trong nghiên cứu

STT	Tên mỗi	Trình tự mỗi
1	PMI-1	5'-ACAGCCACTCTCCATTCA-3'
2	PMI-2	5'-GTTTGCCATCACTTCCAG -3
3	S-cryIA(c)-F1	5'-ACAGAAGACCCTTCAATATC-3'
4	S-cryIA(c)-R1	5'-GTTACCGAGTGAAGATGTAA-3'

**Các chỉ tiêu theo dõi và đánh giá:** Tỷ lệ tạo mô sẹo chuyển gen (%) = Số mô sẹo chuyển gen tạo thành\*100%/Tổng số phôi biến nạp. Tỷ lệ tái sinh cây chuyển gen (%) = Số cây chuyển gen tái sinh\*100%/Tổng số mô sẹo chuyển gen phôi hóa. Hiệu suất biến nạp (%) = Số cây hữu thụ mang gen chuyển \*100%/Tổng số phôi biến nạp.

### III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 1. Đánh giá khả năng chuyển nạp gen kháng sâu *cryIA(c)* vào các dòng ngô lai

Ngô là một trong những cây trồng có phản ứng rất kém với môi trường nuôi cấy nhân tạo. Tất cả các bộ phận như thân, lá, rễ, đỉnh sinh trưởng và mô sẹo hình thành từ các bộ phận này hầu như không có khả năng tái sinh thành cây hoàn chỉnh. Nghiên cứu trước đây đã chỉ ra rằng chỉ có phôi non của một vài dòng ngô mô hình trong đó có dòng HR8, HR9 có khả năng phát sinh mô sẹo phôi hóa, tái sinh cây hoàn chỉnh và đặc biệt là có khả năng tiếp nhận gen ngoại lai (Phạm Thị Lý Thu, 2007), tuy nhiên các dòng mô hình nhập nội này lại có khả năng thích ứng kém trong điều kiện Việt Nam. Trong khi đó khó khăn chính của quá trình chuyển gen

vào cây ngô ở Việt Nam đó là tỷ lệ cây sống sót và hữu thụ thấp (Nguyễn Văn Đồng *et al.*, 2010). Khả năng tái sinh là một tính trạng chất lượng được di truyền, trong đó gen quy định khả năng tái sinh là một gen trội. Vì thế người ta có thể truyền cảm ứng tái sinh từ giống ngô này sang giống ngô khác bằng phương pháp lai hữu tính kết hợp với tái sinh *in vivo*, những dòng lai này có tỷ lệ tái sinh cao hơn, cây có sức sống và khả năng thích nghi tốt hơn khi đưa ra môi trường bên ngoài (Armstrong *et al.*, 1985). Trên cơ sở kết quả của các nghiên cứu trước, đã xác định được dòng ngô mô hình (HR8, HR9) và dòng ngô chọn lọc của Việt Nam (CM8) có khả năng tiếp nhận gen kháng sâu *cryIA(c)*, đồng thời cũng chỉ ra rằng hệ thống biến nạp M với chỉ thị chọn lọc thực vật sử dụng mannose tỏ ra ưu thế hơn hẳn so với hệ thống biến nạp H với chỉ thị chọn lọc thực vật là hygromycin. Trong hai vụ Đông Xuân 2010-2012, phôi non của các dòng ngô lai CH9; HC9 và HC8 được sử dụng làm vật liệu cho chuyển nạp gen kháng sâu *cryIA(c)*. Trong tổng số 3563 phôi biến nạp, thu được 121 cây tái sinh sau chuyển gen, trong đó đã nhận được 77 cây sống sót khi đưa ra đất (bảng 2).

Bảng 2. Kết quả nghiên cứu chuyển gen kháng sâu *cryIA(c)* vào phôi non của các dòng ngô lai (vụ Đông Xuân 2010-2012)

TT	Dòng ngô	Số phôi biến nạp	Số mô sẹo tạo thành	Số chồi tái sinh	Số cây ra rễ	Tỷ lệ tạo mô sẹo (%)	Tỷ lệ tái sinh cây (%)	Số cây sống khi đưa ra đất
1	CH9	2457	1212	230	42	64,43	18,98	39
2	HC9	187	128	39	13	73,56	30,47	9
3	HC8	919	642	94	66	86,06	14,64	29

Tổng số	3563	1982	363	121			77
---------	------	------	-----	-----	--	--	----

Khả năng tiếp nhận gen ngoại lai của các dòng ngô thí nghiệm biểu hiện thông qua mức độ tạo mô sẹo phôi hóa trong môi trường chọn lọc của phôi non sau chuyển gen. So sánh với dòng mô hình ở các nghiên cứu trước (Nguyễn Văn Đồng *et al.*, 2010), kết quả bảng 2 cho thấy các dòng lai cho tỷ lệ tạo mô sẹo và tỷ lệ tái sinh chồi ở mức tương tự. Dòng lai HC8 cho tỷ lệ tạo mô sẹo cao nhất, đạt 86,06% so với 79,3% ở dòng mô hình HR9 (Nguyễn Văn Đồng *et al.*, 2010), dòng ngô lai HC9 có tỷ lệ tái sinh chồi khá cao đạt 30,47% so với 33,1% ở dòng HR9.

Khả năng sống sót của cây tái sinh là một trong những hạn chế lớn nhất của quá trình chuyển gen vào cây ngô. Cũng trong các nghiên cứu trước của nhóm tác giả, khi đưa 250 cây mô hình HR9 chuyển gen tái sinh ra môi trường tự nhiên chỉ thu được 2 cây sống sót. Đối với dòng chọn lọc CM8, số cây sống sót là 41 cây trên tổng số 137 cây chuyển gen tái sinh (Nguyễn Văn Đồng *et al.*, 2010 a, b). So sánh với tỷ lệ 77 cây sống sót trên 121 cây chuyển gen tái sinh của dòng ngô lai, cho thấy các dòng ngô lai có sức sống và khả năng thích nghi với môi trường bên ngoài tốt hơn dòng mô hình và chọn lọc. Kết quả này chứng tỏ các dòng ngô lai chuyển gen đã tiếp nhận được khả năng tái sinh tốt từ dòng mô

hình và tính thích ứng với điều kiện tự nhiên của dòng chọn lọc.

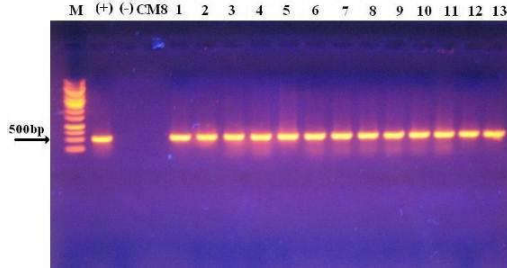
## 2. Phân tích PCR các dòng ngô lai chuyển gen T0

Phân tích PCR với 2 cặp mồi PMI và S-cry1A(c) được tiến hành trên các cây chuyển gen tái sinh, nhằm xác định sự có mặt của gen kháng sâu *cry1A(c)*, gen chọn lọc *pmi*. Trong số 77 cây đưa ra đất chỉ có 71 cây kết hạt. Kết quả phân tích cho thấy, trong 71 mẫu DNA tổng số của 3 dòng ngô thí nghiệm có 55 mẫu cho kết quả dương tính với kích thước băng DNA thu được 514 bp tương ứng với gen *pmi*, 27 mẫu thuộc 3 dòng trên cho kết quả dương tính với kích thước băng DNA thu được 600 bp tương ứng với gen *cry1A(c)* và 9 mẫu thuộc 3 dòng trên cho kết quả dương tính với cả 2 gen. Kết quả được thể hiện trong bảng 3, hình 2 và 3. Trong số các cây hữu thụ của các dòng ngô lai chuyển gen tái sinh chỉ một số ít cây có kết quả PCR dương tính với gen *cry1A(c)* và gen *pmi*, và tỷ lệ này cũng biến động ở các dòng ngô khác nhau. Dòng ngô lai HC8 cho hiệu suất biến nạp cao nhất đạt 1,41% trong khi dòng ngô lai CH9 hiệu suất biến nạp chỉ đạt 0,81%. Khi so sánh với dòng mô hình và dòng chọn lọc, hiệu suất biến nạp của các dòng lai đã được cải thiện. Dòng mô hình HR9 đạt hiệu suất biến nạp 0,83%; dòng chọn lọc CM8 hiệu suất chỉ đạt 0,05% (Nguyễn Văn Đồng *et al.*, 2010).

Bảng 3. Kết quả phân tích PCR các dòng ngô lai chuyển gen T0

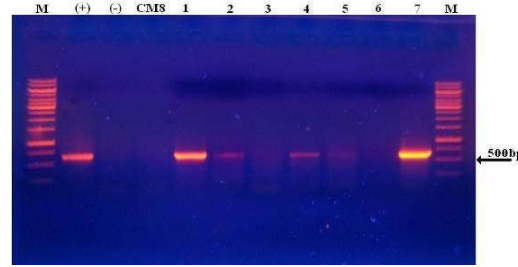
TT	Dòng lai F1	Số phôi biến nạp	Số cây hữu thụ	PCR (+)			Hiệu suất biến nạp gen <i>cry1A(c)</i> (%)
				PMI	Cry1Ac	PMI+Cry1Ac	
1	CH9	2457	38	27	16	4	0,81
2	HC9	187	4	1	1	1	1,06
3	HC8	919	29	27	9	4	1,41

Tổng số	3563	71	55	27	9	
---------	------	----	----	----	---	--



Hình 2: Phân tích PCR gen *pmi* trên các cây T0 của các dòng ngô lai chuyển gen.

M: 1kb DNA marker. (+): đối chứng dương (DNA plasmid pADT2); (-): nước; CM8: dòng WT, Các giếng từ 1-6: các cây thuộc dòng CH9; Các giếng từ 7-12: các cây thuộc dòng HC8; Giếng 13: cây thuộc dòng HC9 có mang gen *pmi*



Hình 3: Phân tích PCR gen *cryIA(c)* trên các cây T0 của các dòng ngô lai chuyển gen.

M: 1kb DNA marker. (+): đối chứng dương (DNA plasmid pADT2); (-): nước; CM8: dòng WT; Giếng 1,2: các cây thuộc dòng CH9; Giếng 4: cây thuộc dòng HC9; Giếng 5,7: các cây thuộc dòng HC8 có mang gen *cryIA(c)*; Giếng 3,6: các cây thuộc dòng HC9 không mang gen *cryIA(c)*.

### 3. Đánh giá đặc tính nông học của các dòng ngô lai chuyển gen T0

Để xác định sự có mặt của gen chuyển *cryIA(c)* có ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng và phát triển của các dòng ngô chuyển gen hay không, tiến hành đánh giá

một số đặc tính nông sinh học chính của các dòng ngô lai chuyển gen T0 đồng thời so sánh giữa dòng lai chuyển gen với dòng mô hình, chọn lọc đã chuyển gen. Kết quả được trình bày ở bảng 4.

Bảng 4. Đánh giá một số đặc tính nông sinh học chính của các dòng ngô lai chuyển gen thế hệ T0

TT	Tên dòng (số cây)	TGST (ngày)	Chiều cao cây (cm)	Số lá TB/cây	Chiều dài bắp (cm)	Đường kính bắp (cm)	Khối lượng hạt/bắp (g)																							
1	CH9 (Đ/C)	116	172,21	19	18,32	4,01	21,84																							
2	CH9 (1-20)	116	171,96	19	18,15	3,97	21,53																							
3	HC9 (Đ/C)	70	15	17,08	3,65	19,25	4	HC9 (1-2)	70	96,52	15	17,47	3,43	18,72	5	HC8 (Đ/C)	73	149,48	17	19,04	4,22	20,69	6	HC8 (1-13)	73	148,91	17	18,73	4,08	20,41
4	HC9 (1-2)	70	96,52	15	17,47	3,43	18,72																							
5	HC8 (Đ/C)	73	149,48	17	19,04	4,22	20,69																							
6	HC8 (1-13)	73	148,91	17	18,73	4,08	20,41																							

Kết quả bảng 4 cho thấy các dòng ngô lai mang gen kháng sâu *cryIA(c)* thế hệ T0 có đặc tính nông học tương tự các dòng ngô lai đối chứng (không chuyển gen), chứng tỏ sự có mặt của gen chuyển *cryIA(c)* không làm ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng và phát triển của các dòng ngô chuyển gen. Các đặc tính ưu việt của dòng ngô chọn lọc

(CM8) như năng suất cao, chất lượng hạt tốt cũng được biểu hiện ở các dòng lai, điều này được thể hiện rõ khi so sánh các đặc tính nông học của các dòng ngô lai chuyển gen với dòng ngô chọn lọc. Khi so sánh với các dòng ngô mô hình (HR8, HR9) đã chuyển gen, các dòng ngô lai chuyển gen tỏ ra ưu thế hơn hẳn. Cây có chiều dài bắp và

khối lượng hạt /bắp cao hơn các dòng ngô mô hình chuyển gen. Vì thế, việc sử dụng các dòng ngô lai làm vật liệu biến nạp đã khắc phục được các tồn tại khi sử dụng

dòng mô hình hay dòng chọn lọc trong các nghiên cứu chuyển gen và tái sinh *invitro*, đồng thời giữ lại được các tính trạng tốt của các dòng bố mẹ (hình 4).



Hình 4: Bắp của cây T0 dòng lai HC9 (A); dòng mô hình HR9 (B) và dòng chọn lọc CM8 (C).

#### IV. KẾT LUẬN

Sử dụng phối hợp từ chưa trưởng thành của các dòng ngô lai F1 giữa dòng mô hình HR9/HR8 và dòng chọn lọc CM8 đã khắc phục được những hạn chế trong quá trình chuyển nạp gen kháng sâu *cryIA(c)* thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* vào các dòng ngô mô hình và dòng chọn lọc. Đã nhận được 27 dòng lai T0 mang gen *cryIA(c)* và 9 dòng mang đồng thời cả hai gen *pmi* và *cryIA(c)*. Trong số 3 dòng ngô lai nghiên cứu, dòng HC8 cho hiệu suất biến nạp cao nhất đạt 1,41%, cao hơn so với dòng chọn lọc có cùng nguồn gốc. Mặt khác, các dòng ngô lai chuyển gen T0 có khả năng sinh trưởng và thích nghi tốt hơn khi đưa ra môi trường bên ngoài so với các dòng ngô mô hình. Các dòng ngô lai mang gen kháng sâu *cryIA(c)* này sẽ là nguồn vật liệu phù hợp cho chọn tạo giống ngô chuyển gen kháng sâu của Việt Nam.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Armstrong CL, Parker GB and Pershing JC (1995) *Field evaluation of European corn borer control in progeny of 173 transgenic corn events expressing an insecticidal protein from Bacillus thuringiensis*. Crop Sci. 35: 550-557.
2. Catangui MA, Berg RK (2006) *Western bean cutworm, Striacosta albicosta (Smith) (Lepidopteran: Noctuidae), as a potential pest of transgenic CryIAb*

*Bacillus thuringiensis corn hybrids in South Dakota*. Environ. Entomol. 35: 1439-1452.

3. Gao Y, Schafer BW, Collins RA, Herman RA, Xu X, Gilbert JR, Ni W, Langer VL, Tagliani LA. (2004) *Characterization of Cry34Ab1 and Cry35Ab1 insecticidal crystal proteins expressed in transgenic corn plants and Pseudomonas fluorescens*. J Agric Food Chem. 52(26):8057-65.
4. Hellmich RL, Albajes R, Bergvinson D, Prasifka JR, Wang ZY, (2008) *The present and future role of insect-resistant GM crops in maize IPM*. In: Romeis J, Shelton AM, Kennedy GG, editors. *Integration of insect-resistant genetically modified crops within IPM programs*. Dordrecht: Springer: 119-158.
5. [Http://agbiotech.com.vn/vn/?mnu=preview&key=3826](http://agbiotech.com.vn/vn/?mnu=preview&key=3826)
6. Nguyễn Văn Đồng, Phạm Thị Lý Thu, Trịnh Minh Thùy, Hà Văn Chiển, Nông Văn Hải (2010a) *Kết quả bước đầu trong nghiên cứu chuyển gen kháng sâu cryIA(c) vào phiến non các dòng ngô mô hình*. Tạp chí Công nghệ Sinh học 7(4): 1-8.

Ngày nhận bài: 20/4/2013

Người phản biện: GS. TSKH. Trần Duy Quý,

ngày 5/5/2013

Ngày duyệt đăng: 3/6/2013