

## ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG ỨC CHẾ CỦA MANNOSE TỚI QUÁ TRÌNH TÁI SINH CÂY THUỐC LÁ ĐỂ XÂY DỰNG HỆ THỐNG CHỌN LỌC MANNOSE TRÊN CÂY CHUYỂN GEN

Lê Thị Thủy<sup>1</sup>, Triệu Thị Hằng<sup>1</sup>, Lâm Đại Nhân<sup>2</sup>, Lê Văn Sơn<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học sư phạm Hà Nội

<sup>2</sup>Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Ngày nhận bài: 15.6.2015

Ngày nhận đăng: 20.3.2016

### TÓM TẮT

Sử dụng các chất chọn lọc thân thiện với môi trường trong chuyển gen thực vật là hướng nghiên cứu được quan tâm đặc biệt trong những năm gần đây, góp phần tăng khả năng thương mại hóa của cây trồng biến đổi gen. Trong nghiên cứu này, manose – một tác nhân chọn lọc tích cực được lựa chọn là chất chọn lọc đối với cây thuốc lá. Khả năng ức chế của manose đối với tái sinh cây thuốc lá đã được đánh giá thông qua ba giai đoạn: giai đoạn tái sinh tạo đa chồi, giai đoạn kéo dài chồi và giai đoạn ra rễ với hai giống thuốc lá K326 và C9-1. Kết quả cho thấy, có thể lựa chọn nồng độ manose là 30 g/l cho giống K326 và 20 g/l cho giống C9-1 ở giai đoạn tạo đa chồi; 30 g/l manose bổ sung 7,5 g sucrose cho giai đoạn kéo dài chồi và 30 g/l manose cho quá trình chọn lọc chồi chuyển gen ở cả 2 giống K326 và C9-1. Hiệu quả chọn lọc của manose trong 2 quy trình chuyển gen với gen đánh dấu *gus* cho thấy tỉ lệ chuyển gen khá cao, dao động từ 16 - 17% ở giống thuốc lá K326 và 9-11% ở giống C9-1. Việc tạo thành công cây thuốc lá chuyển gen sử dụng manose làm chất chọn lọc mở ra hướng mới trong tạo giống cây chuyển gen thân thiện với môi trường.

**Từ khóa:** *Gus*, *manA*, manose, phosphomannose isomerase, thuốc lá

### MỞ ĐẦU

Ngày nay, với sự phát triển của công nghệ sinh học, chuyển gen ở thực vật được xem là một biện pháp hữu hiệu để tạo các giống cây trồng có năng suất, phẩm chất và sức chống chịu cao. Tuy nhiên, sự tồn tại của hệ thống gen chọn lọc kháng kháng sinh hay kháng thuốc diệt cỏ trong các sản phẩm chuyển gen khiến chúng trở thành mối lo ngại đối với sức khỏe và môi trường (Qiao *et al.*, 2010).

Mannose là một loại đường đơn thuộc nhóm aldose, khi được hấp thụ vào cơ thể sẽ bị phosphoryl hóa thành mannose-6-phosphate bởi enzyme hexokinase. Nếu không có sự tồn tại của enzyme phosphomannose isomerase (PMI) chuyển hóa mannose-6-phosphate thành fucose-6-phosphate trong cơ thể, mannose-6-phosphate sẽ được tích lũy trong tế bào gây đối phosphate và ATP. Sự suy giảm phosphate lần lượt dẫn đến tăng tổng hợp tinh bột và maltose, ức chế quá trình sinh trưởng và phát triển của cơ thể (Joersbo *et al.*, 1998). Do vậy, hầu hết các thực vật đều không thể tồn tại trên môi trường chứa mannose vì không có enzyme PMI, chỉ có một số ít loài như cà rốt, khoai lang, cây họ đậu... được chứng

minh là có khả năng sử dụng mannose như một nguồn cacbon (Jain *et al.*, 2007).

PMI được mã hóa bởi gen *manA* có nguồn gốc từ *Escherichia coli* (Miles *et al.*, 1984) là một trong những hệ thống chọn lọc hiệu quả, thân thiện với môi trường đã được sử dụng thành công ở một số loài thực vật như: củ cải đường (Joersbo *et al.*, 1998), kê ngọc trai (O'Kennedy *et al.*, 2004), đu đủ (Zhu *et al.*, 2005), lúa (Penna *et al.*, 2008), lúa mì (Gadaleta *et al.*, 2006), táo (Degenhardt *et al.*, 2006), mía (Jain *et al.*, 2007), đậu tương (Tran Thi Cuc Hoa *et al.*, 2007)... Các kết quả này góp phần tạo ra các sản phẩm biến đổi gen an toàn, làm tăng khả năng thương mại hóa của chúng.

Thuốc lá được xem là cây mô hình để tiến hành nhiều nghiên cứu sinh học cơ bản về chức năng, vai trò cũng như cơ chế hoạt động của các gen hay protein, các con đường trao đổi chất, tổng hợp các chất sơ cấp và thứ cấp ở thực vật hay tương tác giữa thực vật với các sinh vật gây bệnh,... Bên cạnh đó, với khả năng dễ tái sinh và chấp nhận các gen ngoại lai, thuốc lá cũng được sử dụng làm cây mô hình hiệu quả trong các nghiên cứu chuyển gen thực vật,

giúp kiểm chứng khả năng hoạt động, mức độ biểu hiện của các vector chuyển gen.

Trong bài báo này, chúng tôi tiến hành đánh giá mức độ miễn dịch của cây thuốc lá đối với đường mannose thông qua nghiên cứu tác dụng ức chế của mannose đến quá trình tái sinh của hai giống thuốc lá K326 và C9-1. Kết quả được sử dụng cho việc xây dựng quy trình chuyển gen vào thuốc lá sử dụng mannose làm chất chọn lọc. Với vector chuyển gen mang gen chọn lọc *manA* và gen chỉ thị *gusA*, những dòng thuốc lá chuyển gen đầu tiên đã được thu nhận và kiểm tra sự biểu hiện của *gus* kết hợp với PCR.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Vật liệu

#### Vật liệu thực vật

Cây thuốc lá (*Nicotiana tabacum* L.) của 2 giống K326 và C9-1 nuôi cấy trong điều kiện *in-vitro*.

#### Chủng khuẩn

*Agrobacterium tumefaciens* mang cấu trúc pNOV-gusplus, chứa gen *manA* và *gusA*.

Nguồn vật liệu cho nghiên cứu được cung cấp bởi Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học.

#### Phương pháp nghiên cứu

#### Xác định nồng độ mannose cho chọn lọc cây thuốc lá chuyển gen

Quá trình tái sinh cây thuốc lá chuyển gen trải qua ba giai đoạn là giai đoạn tạo chồi, kéo dài chồi và ra rễ. Vì vậy, để xây dựng được hệ thống chọn lọc hoàn chỉnh, chúng tôi tiến hành thực hiện nghiên cứu sự ảnh hưởng của mannose ở ba giai đoạn trên ở hai giống thuốc lá đang được trồng phổ biến ở Việt Nam là K326 và C9-1.

#### Xác định nồng độ mannose chọn lọc cho giai đoạn tạo chồi

Các mảnh lá thuốc lá kích thước khoảng 1 cm<sup>2</sup> của 2 giống thuốc lá C9-1 và K326 được đặt vào môi trường MS + BAP (1 mg/l) + đường mannose + agar 7,5 g/l, pH = 5,8. Trong đó nồng độ mannose bổ sung vào môi trường lần lượt là: 0; 10; 20; 30; 40; 50 g/l (kí hiệu từ CT1 đến CT6). Theo dõi thí nghiệm trong 4 tuần, đánh giá kết quả thông qua: tỉ lệ mẫu tái sinh, tỉ lệ mẫu không tái sinh, tỉ lệ mẫu chết, số chồi trung bình (TB)/ mẫu và chất lượng chồi.

#### Xác định nồng độ sucrose thích hợp trên nền chọn lọc mannose cho giai đoạn kéo dài chồi.

Các cụm chồi thuốc lá thu được sau 2 tuần tái sinh từ các mảnh lá ở môi trường MS + BAP 1 mg/l + sucrose 30 g/l với tỉ lệ tạo chồi trung bình là 5 chồi/cụm ở C9-1 và 6 chồi/cụm đối với K326 sẽ được đặt vào môi trường nghiên cứu là MS + mannose 30 g/l + đường sucrose + agar 7,5 g/l, pH=5,8. Trong đó nồng độ sucrose thay đổi tương ứng theo 5 công thức (kí hiệu theo thứ tự từ SM1 đến SM5) là: 0; 2,5; 5; 7,5; 10 g/l. Mỗi công thức cấy 6 bình tam giác với tổng số cụm chồi thí nghiệm là 30.

Theo dõi thí nghiệm trong 2 tuần, đánh giá kết quả thông qua số chồi kéo dài trung bình (TB)/cụm và tỉ lệ chồi kéo dài.

#### Xác định nồng độ mannose thích hợp cho quá trình ra rễ

Chồi thuốc lá có kích thước 2-3 cm, hình thành trên môi trường MS với đường sucrose được đặt vào môi trường MS + mannose + agar 7,5 g/l, pH=5,8. Trong đó, nồng độ mannose thay đổi theo các công thức thí nghiệm (kí hiệu theo thứ tự là ĐC, M10 đến M30) là: 0; 10; 15; 20; 25; 30 g/l. Mỗi công thức cấy 6 bình tam giác với tổng số chồi cấy là 48.

Theo dõi thí nghiệm trong 2 tuần, đánh giá kết quả thông qua số chồi tạo rễ, chất lượng cây và rễ.

#### Đánh giá hiệu quả chọn lọc của mannose trong hai quy trình chuyển gen vào thuốc lá.

Mảnh lá của hai giống thuốc lá K326 và C9-1 được nhiễm khuẩn *A. tumefaciens* mang vector chuyển gen trong thời gian 10 phút. Sau đó, các mảnh lá được đặt trên môi trường đồng nuôi cấy 2 ngày. Sau 2 ngày, mảnh lá được chuyển sang môi trường chọn lọc để lựa chọn các chồi chuyển gen. Chúng tôi tiến hành đánh giá hiệu quả chuyển gen khi sử dụng mannose làm chất chọn lọc theo 2 quy trình: Quy trình 1, sử dụng mannose cho cả 3 giai đoạn tái sinh và quy trình 2 chỉ sử dụng mannose với nồng độ 30 g/l ở giai đoạn ra rễ. Đánh giá hiệu quả chọn lọc của 2 quy trình dựa vào số mẫu biểu hiện *gus* tạm thời và PCR, tỉ lệ chuyển gen. Mỗi quy trình biến nạp lặp lại 2 lần với số mảnh lá thí nghiệm là 50 mảnh/lô thí nghiệm.

Các chồi ra rễ, sinh trưởng tốt trên môi trường khi đạt chiều cao 4 - 6 cm sẽ tiến hành ra cây ở nhà lưới.

#### Phân tích cây chuyển gen bằng phương pháp nhuộm mô hóa tế bào

Cụm chồi, lá và chồi thuốc lá sau chuyển gen được ngâm trong dung dịch X-Gluc 1% đặt trong tủ 37<sup>0</sup>C qua đêm. Sau đó mẫu ngâm được rửa bằng cồn 70<sup>0</sup> để loại bỏ diệp lục.

**Phân tích cây chuyển gen bằng phương pháp PCR**

DNA tổng số từ lá thuốc lá được tách chiết và sử dụng làm khuôn mẫu cho phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu nhằm xác định sự có mặt của gen chuyển trong các dòng thuốc lá. Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 0,8%.

**Phương pháp xử lý số liệu**

Số liệu thí nghiệm được xử lý bằng phần mềm xử lý thống kê SPSS phiên bản 18. Sự sai khác giữa các giá trị được xác định bằng Oneway- ANNOVA (turkey's-b) ở mức ý nghĩa  $\alpha = 0,05$

**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

**Xác định nồng độ mannose chọn lọc thích hợp cho giai đoạn tạo đa chồi**

Các mảnh lá của 2 giống K326 và C9-1 với diện tích 1 cm<sup>2</sup> được đặt trong môi trường có nồng độ mannose thay đổi theo 6 công thức lần lượt là 0, 10, 20, 30, 40, 50 g/l. Sau 4 tuần theo dõi, kết quả (bảng 1 và bảng 2) cho thấy: các mảnh lá đặt trên môi trường có mannose (10g/l) cho khả năng tái sinh và tạo chồi mạnh nhất (K326 là 93,33% cho tỉ lệ tái sinh với 5,32 chồi TB/mẫu, C9-1 cho tỉ lệ tái sinh 100%, với 4,87 chồi TB/mẫu), không có mảnh lá nào bị ức chế hay chết. Ngoài ra, các chồi được tạo ra đều phát triển hoàn thiện, có màu xanh, thân mập

(Hình 1). Tuy nhiên, khi tăng nồng độ mannose lên 20 - 50 g/l thì khả năng tái sinh và tạo chồi của thuốc lá giảm dần. Đồng thời, tỉ lệ mẫu vàng, không tái sinh, mẫu chết tăng lên và chất lượng chồi cũng giảm dần, thể hiện tiềm năng ức chế của mannose. Mặt khác, khi so sánh kết quả 2 giống, chúng tôi thấy, các mảnh lá của giống thuốc lá C9-1 bị ức chế hoàn toàn ngay từ nồng độ mannose là 30 g/l, thấp hơn nhiều so với K326 (50 g/l). Hơn nữa, khả năng tạo chồi, khả năng sinh trưởng của chồi ở giống thuốc lá C9-1 đều thấp hơn so với giống K326. Nguyên nhân là do sự khác biệt về kiểu gen, quy định sự khác nhau về đặc điểm hình thái của hai giống: C9-1 có lá mỏng, ít lông hơn, nhạy cảm với mannose hơn so với K326. Kết quả này có thể lí giải rằng: trong bản thân thuốc lá đã có mặt của gen mã hóa cho enzyme PMI, chuyển hóa mannose-6-phosphate thành fructose-6-phosphate. Ở nồng độ mannose thấp (10 g/l), thuốc lá có khả năng sử dụng mannose làm nguồn cacbon, từ đó sẽ sinh trưởng và phát triển bình thường như ở môi trường MS có bổ sung sucrose. Nhưng khi nồng độ mannose tăng lên, hệ thống PMI tự nhiên thấp, hoạt động không hiệu quả gây ức chế quá trình sinh trưởng và phát triển của cây (Joersbo *et al.*, 1998). Mặt khác, có thể khi nồng độ đường trong môi trường tăng lên quá cao (50 g/l) sẽ tạo môi trường ưu trương, áp suất thẩm thấu tăng lên, mô nuôi cấy khó hút được nước, thậm chí là mất nước, dẫn đến sinh trưởng và phát triển kém.

Từ kết quả nghiên cứu thu được, chúng tôi sẽ sử dụng đường mannose với các nồng độ là 30 g/l đối với K326 và 20 g/l đối với C9-1 làm chất chọn lọc ở giai đoạn tạo đa chồi của mô lá thuốc lá chuyển gen.

**Bảng 1.** Ảnh hưởng của nồng độ mannose tới quá trình tái sinh, tạo đa chồi ở giống thuốc lá K326.

Công thức	Tỷ lệ (%)			Số chồi		Chất lượng chồi
	Tái sinh	Vàng/không tái sinh	Chết	Tổng số chồi	Số chồi TB/mẫu	
CT1	60	36,67	3,33	56	3,11 <sup>c</sup> ± 0,254	+++
CT2	93,33	6,67	0	149	5,32 <sup>d</sup> ± 0,330	+++
CT3	66,67	20	13,33	43	2,15 <sup>bc</sup> ± 0,196	++
CT4	53,33	30	16,67	28	1,75 <sup>b</sup> ± 0,194	+
CT5	30	43,33	26,67	6	0,67 <sup>a</sup> ± 0,236	-
CT6	0	26,67	73,33	0	0	--

**Bảng 2.** Ảnh hưởng của nồng độ mannose tới quá trình tái sinh, tạo đa chồi ở giống thuốc lá C9-1.

Công thức	Tỷ lệ (%)			Số chồi		Chất lượng chồi
	Tái sinh	Vàng/không tái sinh	Chết	Tổng số chồi	Số chồi TB/mẫu	
CT1	100	0	0	76	2,53 <sup>a</sup> ± 0,202	+
CT2	100	0	0	140	4,87 <sup>b</sup> ± 0,266	++
CT3	63,33	33,33	6,67	30	1,93 <sup>a</sup> ± 0,182	+
CT4	0	100	0	0	0	--
CT5	0	100	0	0	0	--
CT6	0	36,67	63,33	0	0	--

**Ghi chú:** Các chữ cái a, b, c thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê giữa các công thức trong cùng một cột với độ tin cậy 95%.

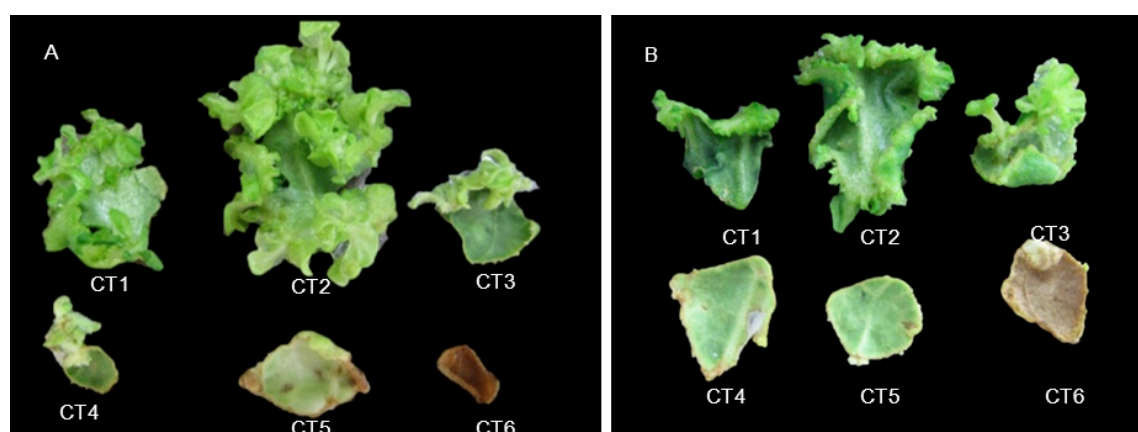
+++ : Chồi phát triển hoàn thiện, có màu xanh, thân chồi mập và nhiều lá

++ : Chồi xanh, thân chồi ngắn, lá phát triển không đều;

+ : Chồi có màu vàng xanh, thân chồi ngắn, ít lá;

- : Chồi có màu vàng, phát triển không hoàn thiện, không có khả năng tạo cây hoàn chỉnh (chồi chết sau 4 tuần theo dõi);

-- : Không đánh giá.

**Hình 1.** Ảnh hưởng của nồng độ mannose tới khả năng tái sinh của mảnh lá thuốc lá. A, Mannose ảnh hưởng tới khả năng tạo chồi của giống K326; B, Mannose ảnh hưởng tới khả năng tạo chồi của giống C9-1.**Bảng 3.** Ảnh hưởng của sucrose trên nền chọn lọc mannose tới khả năng kéo dài chồi của giống thuốc lá K326.

Công thức	Man : Suc	Số cụm chồi TN	Số chồi TB/cụm	Chồi kéo dài		
				Số lượng	Số chồi kéo dài TB/cụm	Tỷ lệ (%)
SM1	30 : 0	6 × 5	6	75	2,5 <sup>a</sup> ± 0,239	41,67
SM2	30 : 2,5	6 × 5	6	101	3,37 <sup>b</sup> ± 0,232	56,11
SM3	30 : 5	6 × 5	6	113	3,77 <sup>b</sup> ± 0,252	62,78
SM4	30 : 7,5	6 × 5	6	124	4,13 <sup>b</sup> ± 0,248	68,89
SM5	30 : 10	6 × 5	6	115	3,83 <sup>b</sup> ± 0,307	63,89

**Bảng 4.** Ảnh hưởng của sucrose trên nền chọn lọc mannose tới khả năng kéo dài chồi của giống thuốc lá C9-1.

Công thức	Man : Suc	Số cụm chồi TN	Số chồi TB/cụm	Chồi kéo dài		
				Số lượng	Số chồi kéo dài TB/cụm	Tỷ lệ (%)
SM1	30 : 0	6 × 5	5	60	2,0 <sup>a</sup> ± 0,249	40
SM2	30 : 2,5	6 × 5	5	67	2,23 <sup>a</sup> ± 0,241	44,67
SM3	30 : 5	6 × 5	5	81	2,70 <sup>a</sup> ± 0,252	54
SM4	30 : 7,5	6 × 5	5	92	3,07 <sup>a</sup> ± 0,389	61,33
SM5	30 : 10	6 × 5	5	89	2,97 <sup>a</sup> ± 0,347	59,33

**Ghi chú:** Các chữ cái a, b, c thể hiện sự sai khác có ý nghĩa thống kê giữa các công thức trong cùng một cột với độ tin cậy 95%).

**Xác định nồng độ sucrose thích hợp trên nền chất chọn lọc mannose cho giai đoạn kéo dài chồi**

Để giảm bớt sự ức chế của mannose, sucrose đã được đưa vào môi trường có chứa 30 g/l mannose trong giai đoạn kéo dài chồi. Kết quả cho thấy, tỉ lệ các chồi được kéo dài và số chồi kéo dài trung bình/cụm tăng lên khi tăng nồng độ sucrose từ 0 g/l đến 7,5 g/l. Tuy nhiên, các chỉ tiêu này lại giảm nhẹ khi tăng sucrose lên 10 g/l (Bảng 3 và Bảng 4). Điều này chứng tỏ, sucrose khi được bổ sung vào môi trường có thể làm giảm bớt khả năng ức chế do mannose tạo ra nhưng không thể loại bỏ hoàn toàn tác dụng chọn lọc của mannose. Kết quả này phù hợp với các nghiên cứu trên một số đối tượng cây trồng khác về vai trò của sucrose trong việc điều chỉnh tác dụng ức chế của mannose (Joersbo *et al.* 1998), (Bakshi *et al.*, 2012), (Zhu *et al.*, 2005). Dựa trên kết quả thu được, chúng tôi lựa chọn môi trường

có chứa 30 g/l mannose và 7,5 g/l sucrose cho thí nghiệm chọn lọc cây thuốc lá chuyển gen.

**Xác định nồng độ mannose chọn lọc thích hợp cho giai đoạn ra rễ**

Sau 2 tuần theo dõi sự ra rễ, nhận thấy sự sinh trưởng của chồi thuốc lá nhạy cảm hơn với manose so với quá trình sinh trưởng và phát triển của các mảnh lá. Sự tăng dần nồng độ manose có ảnh hưởng rõ rệt đến tỉ lệ chồi *in vitro* ra rễ và đặc biệt là chất lượng rễ. Thời gian ra rễ của các chồi tăng lên, tỉ lệ ra rễ cùng với chất lượng rễ giảm mạnh khi tăng nồng độ mannose từ 0 - 25 g/l (Bảng 5). Hơn nữa, cùng với việc tăng nồng độ mannose, độ cứng và màu sắc của chồi cũng tăng lên. Khi môi trường chứa 30 g/l mannose, sự ra rễ ở các chồi thuốc lá bị ức chế hoàn toàn (Bảng 5, Hình 2). Vì vậy, các chồi thuốc lá chuyển gen sẽ được chọn lọc hiệu quả khi đặt vào môi trường chứa 30 g/l mannose.

**Bảng 5.** Ảnh hưởng nồng độ mannose tới quá trình tạo rễ của chồi thuốc lá thuộc hai giống K326 và C9-1.

Công thức	Nồng độ manose (g/l)	Tổng số chồi TN	Số lượng chồi ra rễ		Tỷ lệ ra rễ (%)		Chất lượng cây và rễ (điểm)
			K326	C9-1	K326	C9-1	
ĐC	0	48	48	48	100	100	5
M10	10	48	31	20	64,58	41,67	4
M15	15	48	22	14	45,83	29,17	3
M20	20	48	16	9	33,33	18,75	2
M25	25	48	8	6	16,67	12,5	1
M30	30	48	0	0	0	0	-

**Ghi chú:** 5 điểm: rễ xuất hiện sớm sau 1 tuần, cây xanh khỏe, rễ trắng, dài và nhiều rễ phụ; 4 điểm: rễ xuất hiện sau 10 ngày, rễ trắng, ngắn, ít rễ phụ, cây thấp; 3 điểm: rễ xuất hiện sau 10 ngày, rễ có màu trắng vàng, ngắn, không có rễ phụ, cây thấp và cứng, màu xanh đậm; 2 điểm: rễ xuất hiện sau 2 tuần, rễ vàng, cứng, ngắn và không có rễ phụ, cây cứng, chậm sinh trưởng; 1 điểm: rễ xuất hiện sau 2 tuần, vàng, không có rễ phụ, cây bị già hóa.



**Hình 2.** Ảnh hưởng của mannose tới quá trình tạo rễ của chồi thuốc lá giống C9-1.

### Xây dựng hệ thống chọn lọc cây thuốc lá chuyển gen sử dụng mannose là chất chọn lọc

Kết quả xác định nồng độ mannose thích hợp cho các giai đoạn tái sinh của cây thuốc lá cho thấy, giai đoạn ra rễ là nhạy cảm với mannose nhất. Vì vậy, chúng tôi thực hiện chuyển gen và tái sinh cây thuốc lá chuyển gen theo 2 quy trình, một là sử dụng mannose cho chọn lọc ở cả 3 giai đoạn và hai là chỉ sử dụng mannose ở giai đoạn ra rễ, nhằm tìm ra một quy trình chuyển gen vào thuốc lá sử dụng chất chọn lọc mannose một cách hiệu quả.

Sau khi tiến hành biến nạp, chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*, các mảnh thuốc lá được đặt vào các môi trường tái sinh khác nhau theo 2 quy trình. Kết quả được thể hiện ở bảng

6, 7 và Hình 3). Xét về tỉ lệ chuyển gen, kết quả nghiên cứu thu được cho thấy: tỉ lệ chuyển gen ở 2 quy trình có sự chênh lệch không lớn (17% với K326, 11% với C9-1 ở quy trình 1 và 16% với K326, 9% với C9-1 ở quy trình 2).

Mặt khác, chúng tôi thấy rằng, ở cả 2 quy trình, khi sử dụng mannose là chất chọn lọc cho tái sinh cây thuốc lá chuyển gen, không có chồi nào bị hoại tử như ở chọn lọc sử dụng kháng sinh. Nguyên nhân là do đường mannose không làm chết tế bào như các chất kháng sinh, nó chỉ bị phosphoryl hóa thành mannose-6-phosphate dưới tác dụng của hexokinase, ức chế sinh trưởng của tế bào không chuyển gen. Điều này cũng giúp cải thiện đáng kể chất lượng chồi và rễ của cây chuyển gen, làm tăng tỉ lệ sống sót của cây khi ra nhà lưới (Bakshi *et al.*, 2012).



**Hình 3.** Kết quả chuyển gen vào cây thuốc lá giống K326. A, Lá biểu hiện gus; B, Cây chuyển gen sống trên môi trường mannose; C, Rễ cây chuyển gen trên môi trường mannose.

**Bảng 6.** Hiệu quả chọn lọc cây thuốc lá chuyển gen sử dụng mannose ở cả ba giai đoạn tái sinh (quy trình 1).

Giống	SL mẫu	Mẫu tạo chồi	Số chồi tách		Số chồi ra rễ	Biểu hiện <i>gus</i>		Tỉ lệ chuyển gen (%)
			Chồi TB/cụm	Tổng số chồi		Tạm thời *	PCR	
<b>K326</b>	2 × 50	49	1,27 ± 0,150	127	24	15/20	17	17
<b>WT-K326</b>	2 × 5	4	0,9 ± 0,314	9	0	0	0	0
<b>C9-1</b>	2 × 50	59	1,33 ± 0,145	133	15	11/20	11	11
<b>WT- C9-1</b>	2 × 5	3	0,6 ± 0,221	6	0	0	0	0

**Bảng 7.** Hiệu quả chọn lọc cây thuốc lá chuyển gen sử dụng mannose ở giai đoạn ra rễ (quy trình 2).

Giống	SL mẫu	Mẫu tạo chồi	Số chồi tách		Số chồi ra rễ	Biểu hiện <i>gus</i>		Tỉ lệ chuyển gen (%)
			Chồi TB/cụm	Tổng số chồi		Tạm thời *	PCR	
<b>K326</b>	2 × 50	91	4,7 ± 0,227	470	28	15/20	16	16
<b>WT-K326</b>	2 × 5	9	5,4 ± 0,581	54	1	0	0	0
<b>C9-1</b>	2 × 50	79	2,86 ± 0,206	287	21	10/20	9	9
<b>WT- C9-1</b>	2 × 5	9	4,7 ± 0,448	47	0	0	0	0

**Ghi chú bảng 6, 7:** WT-K326, WT-C9-1: Cây thuốc lá không chuyển gen giống K326 và C9-1; (\*): Kiểm tra sự biểu hiện tạm thời của gen *gus* bằng cách nhuộm 10 cụm chồi, lấy từ 10 mảnh lá khác nhau (không tính vào số lượng mẫu trong lô chuyển gen) sau 3 tuần nuôi cấy trên môi trường tạo đa chồi.

## KẾT LUẬN

Hệ thống chọn lọc cây thuốc lá chuyển gen sử dụng mannose làm chất chọn lọc đã được xây dựng thành công với tỉ lệ chuyển gen dao động từ 16 - 17% ở giống K326 và 9 - 11% ở giống C9-1. Nồng độ mannose sử dụng trong tái sinh và chọn lọc cây chuyển gen qua 3 giai đoạn lần lượt là: 30 g/l với K326 và 20 g/l với C9-1 ở giai đoạn tạo đa chồi; 30 g/l mannose và 7,5 g/l sucrose ở giai đoạn kéo dài chồi và ở giai đoạn ra rễ là 30 g/l.

**Lời cảm ơn:** Công trình này được thực hiện tại phòng Công nghệ tế bào thực vật và phòng Công nghệ ADN Ứng dụng, Viện Công nghệ sinh học.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bakshi S, Saha B, Roy NK, Mishra S, Panda SK, Saho L (2012) Successful recovery of transgenic cowpea (*Vigna unguiculata*) using the 6-phosphomannose isomerase gene as the selectable. *Plant Cell Rep* 31: 1093-1103.

Degenhardt J, Poppe A, Montag J, Szankowski I (2006) The use of the phosphomannose-isomerase/mannose selection system to recover transgenic apple plants. *Plant Cell Rep* 25: 1149-1156.

Gadaleta A, Giancaspro A, Blechlb A, Blanco A (2006) Phosphomannose isomerase, *pmi*, as a selectable marker gene for durum wheat transformation. *J Cereal Sci* 43: 31-37.

Jain M, Chengalrayan K, Abouzid A, Gallo M (2007) Prospecting the utility of a PMI/mannose selection system for the recovery of transgenic sugarcane (*Saccharum spp. hybrid*) plants. *Plant Cell Rep* 26: 581-590.

Joersbo M, Donaldson I, Kreiberg J, Petersen SG, Brunstedt J, Okkels FT (1998) Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet. *Mol Breed* 4: 111-117.

Miles JS, and Guest JR (1984) Nucleotide sequence and transcriptional start point of the phosphomannose isomerase gene (*manA*) of *Escherichia coli*. *Gene* 32: 41-48.

O'Kennedy MM, Burger JT, Botha FC (2004) Pearl millet transformation system using the positive selectable marker gene phosphomannose isomerase. *Plant Cell Rep* 22: 684-690.

Penna S, Ramaswam MB, Vishvas B, Anant (2008) Mannose-Based Selection with Phosphomannose isomerase (*PMI*) gene as a positive selectable marker for rice genetic transformation. *J Crop Sci Biotech* 11: 233-236.

Qiao GR, Zhou J, Jiang J, Sun YH, Pan LY, Song HG, Jiang JM, Zhuo RY, Wang XJ, Sun ZX (2010) Transformation of *Liquidambar formosana* L. via *Agrobacterium tumefaciens* using a mannose selection system and recovery of salt tolerant lines. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 102: 163–170.

Tran Thi Cuc Hoa (2007) Assessment of the inhibition

ability of mannose on soybean seed germination, shoot elongation and rooting for the establishment of a mannose selection system in soybean transformation. *Omonrice* 15: 21-28.

Zhu YJ, Agbayani R, McCafferty H, Albert HH, Moore PH (2005) Effective selection of transgenic papaya plants with the PMI/Man selection system. *Plant Cell Rep* 24: 426–432.

## ASSESSMENT OF THE MANNOSE INHIBITION ON TOBACCO REGENERATION FOR ESTABLISHMENT OF A MANNOSE SELECTION SYSTEM FOR TRANSGENIC PLANTS

Le Thi Thuy<sup>1</sup>✉, Trieu Thi Hang<sup>1</sup>, Lam Dai Nhan<sup>2</sup>, Le Van Son<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Hanoi National University of Education

<sup>2</sup>Institute of Biotechnology, Vietnam Academy of Science and Technology

### SUMMARY

Recently, the application of environmentally friendly methods in transgenic-plant selection has been exploited with an interest to contribute to the commercialization of transgenic products. In this study, mannose was chosen in selecting transgenic tobacco. The ability of mannose to inhibit tobacco regeneration was assessed through three stages: creating multi-shoot, elongating shoot, and rooting of tobacco cultivars K326 and C9-1. The results showed that mannose concentrations at 30 g/l and 20 g/l are suitable for creating multi-shoot of K326 and C9-1, respectively. In addition, mannose concentration at 30 g/l in combination with 7,5 g/l sucrose is fit for elongating shoot while its concentration at 30 g/l is appropriate for rooting transgenic tobacco in both K326 and C9-1 cultivars. The mannose selection of transgenic tobacco using *gus* gene showed that the transgenic effectiveness is ranging 16-17% of K326 and 9-11% of C9-1 cultivars. The successful establishment of mannose selection system in transgene tobacco contributes to generate bio-safety transgenic plants.

**Keywords:** *Gus*, *manA*, mannose, phosphomannose isomerase, tobacco

---

✉ Author for correspondence: Tel: +84-986466739; E-mail: [hienthuy20@gmail.com](mailto:hienthuy20@gmail.com)