

TẠO CÂY KHOAI LANG CHUYỂN GEN MANG CẤU TRÚC GEN *CRY3Ca1* THÔNG QUA VI KHUẨN *Agrobacterium tumefaciens*

Vũ Thị Lan^{1*}, Phạm Bích Ngọc², Chu Hoàng Hà², Lê Trần Bình²

¹Trường Đại học Khoa học, Đại học Thái Nguyên, Việt Nam

²Viện Công nghệ Sinh học, VAST, Việt Nam

TÓM TẮT: Khoai lang là một trong số các cây lương thực quan trọng ở Việt Nam và trên thế giới, có giá trị kinh tế và dinh dưỡng cao, tuy nhiên, sản xuất khoai lang vẫn còn bị hạn chế bởi dịch bệnh, cỏ dại và côn trùng. Chuyển gen là phương pháp cải biến di truyền ở khoai lang và tạo ra giống có khả năng kháng lại sâu hại. Trong nghiên cứu này, chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* chứa vector chuyển gen pBI101 mang cấu trúc gen *cry3Ca1* được chuyển thành công vào giống khoai lang KB1. Mô sẹo chuyển gen được chọn lọc trên môi trường (SM) bổ sung kháng sinh kanamycin và cefotaxime, sau đó được chuyển sang môi trường cảm ứng phôi (EG2) trong khoảng 2–3 tuần. Chồi chuyển gen thu được trên môi trường tái sinh chọn lọc (RM) bổ sung kinetin 0,5 mg/L, BAP 1,0 mg/L và ra rễ trên môi trường ra rễ chọn lọc (RR). Kết quả nuôi cấy và chọn lọc theo quy trình trên, chúng tôi thu được 62 dòng khoai lang chuyển gen kháng kanamycin, hiệu quả tái sinh cây chuyển gen đạt 1,79%. Các dòng khoai lang này được phân tích bằng kỹ thuật PCR, lai Southern và đánh giá khả năng kháng bọ hà. Chúng tôi đã thu được 7 dòng khoai lang dương tính với kỹ thuật PCR, 5 dòng mang một bản sao gen chuyển bằng phương pháp lai Southern, hai dòng khoai lang chuyển gen có mức độ gây hại bởi bọ hà, *Cylas formicarius*, thấp hơn 1,31–1,35 lần so với đối chứng.

Từ khóa: *Agrobacterium tumefaciens*, *Ipomoea batatas*, chuyển gen, gen *Cry3Ca1*.

MỞ ĐẦU

Khoai lang là một trong số cây lương thực quan trọng trên thế giới và ở Việt Nam. Khoai lang là nguồn thực phẩm có giá trị, giàu vitamin, khoáng chất và chất xơ, là thức ăn chăn nuôi, nguyên liệu thô của ngành công nghiệp. Tuy nhiên, sản xuất khoai lang ở nhiều vùng trên thế giới còn bị hạn chế do dịch bệnh, cỏ dại và côn trùng. Trong số các sâu hại khoai lang, bọ hà (*Cylas formicarius*) là loài sâu hại nguy hiểm trên thế giới cũng như ở Việt Nam. Chuyển gen là phương pháp cải biến di truyền ở khoai lang nhằm tạo ra cây trồng có khả năng kháng lại sâu hại.

Các phương pháp chuyển gen vào khoai lang đã được nghiên cứu sử dụng như phương pháp chuyển gen nhờ xung điện (Mitchell et al., 1998), sử dụng súng bắn gen hoặc chuyển gen thông qua vi khuẩn *A. rhizogenes* (Okada & Saito, 2009; Yi et al., 2007; Yu et al., 2007). Đã có nhiều công trình nghiên cứu sử dụng thành công phương pháp chuyển gen thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* để tạo cây khoai lang chuyển gen với các tính trạng khác nhau như

kháng thuốc diệt cỏ, kháng virus (Anwar et al., 2011; Otani et al., 2003; Sivparsad & Gubba, 2014), cải thiện chất lượng dinh dưỡng (Wakita et al., 2001), thay đổi thành phần tinh bột trong củ (Shimada et al., 2006) và kháng côn trùng (García et al., 2000; Mora'n et al., 1998; Newell et al., 1995).

Các gen liên quan đến tính kháng bọ hà khoai lang được phân lập từ vi khuẩn *Bacillus*. Nhóm gen *cry3* và *cry8* là nhóm gen mã hóa cho các protein được xác định là có hoạt lực cao đối với nhóm côn trùng cánh cứng. Gen *vip* mã hóa các protein Vip ở pha sinh dưỡng trong chu trình phát triển của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* và *Bacillus cereus* có hoạt lực diệt côn trùng với phổ tác dụng mạnh hơn các protein độc do gen *cry* mã hóa. Các gen *cry3Ca1*, *cry8Db* và *vip2-1* đã được chứng minh là có hoạt tính diệt bọ hà khoai lang và được thiết kế vào vector chuyển gen sử dụng cho chuyển gen thông qua *A. tumefaciens* vào giống khoai lang KB1 (Phạm Bích Ngọc và nnk., 2012). Trong một số công bố trước đây, chúng tôi đã đề cập đến kết quả về chuyển gen *vip2-1* và gen *Cry8Da* để tạo tính kháng bọ hà ở

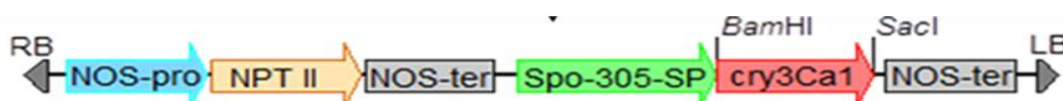
giống khoai lang KB1 (Pham Bich Ngoc et al., 2015; Vũ Thị Lan và nmk., 2015). Trong bài báo này, chúng tôi trình bày kết quả về chuyển gen *cry3Ca1* vào giống khoai lang KB1 thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu thực vật là giống khoai lang KB1 do Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam cung cấp.

Chúng vi khuẩn, các vector và cặp môi sử

dụng gồm: chủng *A. tumefaciens* C58 mang cấu trúc pBI101/*cry3Ca1* trong đó *cry3Ca1* hoạt động dưới sự điều khiển của promoter sporamin biểu hiện đặc hiệu ở củ và gen chọn lọc *nptII* được cung cấp bởi Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ Sinh học (hình 1). Cặp môi sử dụng trong nghiên cứu để kiểm tra sự có mặt của gen *cry3Ca1*: *cry3Ca1* op_F(GTTTAAGGATTATGTTTCCGCCCT) và *cry3Ca1* op_R (ATTCAAGGTTTTGGACATCCAGAG) được tổng hợp tại công ty MWG, CHLB Đức.



Hình 1. Cấu trúc đoạn T- DNA của vector chuyển gen pBI101/spo mang cấu trúc gen *cry3Ca1*

Phương pháp chuyển gen vào khoai lang thông qua vi khuẩn *Agrobacterium*

Thí nghiệm chuyển gen vào thực vật: Vật liệu chuyển gen là đỉnh chồi của giống khoai lang KB1 *in vitro* 2–3 tuần, được cắt thành các mẫu có kích thước khoảng 0,3–0,5 cm. Chúng vi khuẩn *A. tumefaciens* C58 mang gen đích *cry3Ca1* được nuôi tạo dịch huyền phù với mật độ tế bào vi khuẩn OD_{600nm} 0,8. Dịch huyền phù vi khuẩn được ly tâm với tốc độ 4500 vòng/phút, ở 4°C trong 10 phút để thu cặn tế bào và hòa tan lại trong môi trường 1/2 MS để tạo huyền phù vi khuẩn. Nguyên liệu thực vật đã chuẩn bị được nhiễm với dịch huyền phù vi khuẩn trong 30 phút. Sau đó, các mảnh cây được thấm khô với giấy lọc vô trùng và cấy lên môi trường đồng nuôi cây ĐNC trong khoảng thời gian 2–3 ngày và nuôi trong buồng tối.

Tạo mô sẹo phân hóa: Để lựa chọn các thể chuyển gen, mẫu sau khi đồng nuôi cây được rửa khuẩn và chuyển lên môi trường diệt khuẩn (DK), nuôi cây khoảng 7 ngày, tiếp theo cấy chuyển lên môi trường chọn lọc mô sẹo (SM) nuôi trong điều kiện sáng khoảng 25–30 ngày. Các mô sẹo sống sót trên môi trường SM được cấy chuyển lên môi trường cảm ứng phân hóa (EG2) trong khoảng 7–10 ngày.

Tái sinh cây từ mô sẹo: Mô sẹo trên môi trường EG2 được chuyển sang môi trường tái sinh (RM), nuôi cây cho đến khi chồi tái sinh. Chồi tái sinh được cấy chuyển lên môi trường ra rễ (RR). Những chồi sống sót và ra rễ trên môi trường RR khi có khoảng 8–10 lá, thân cao

10–15 cm được ra cây, chăm sóc cách ly trong điều kiện buồng sinh trưởng. Sau khoảng 3 tuần được chuyển sang trồng trong các chậu đất ở điều kiện nhà lưới.

Các môi trường chọn lọc gồm SM, RM, EG2 bổ sung kanamycin 50 mg/l, môi trường RR bổ sung kanamycin 100 mg/l.

Phân tích cây chuyển gen bằng các kỹ thuật sinh học phân tử

Phân tích PCR: DNA tổng số được chiết từ mô lá tươi của cây khoai lang chuyển gen và cây đối chứng không chuyển gen bằng phương pháp CTAB (Garvel & Jarret, 1991) có cải tiến. DNA tổng số (1 µg) của các cây khoai lang chuyển gen được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR. Tổng thể tích phản ứng PCR là 20 µL bao gồm DNA tổng số (50 ng/µL) (1 µL); Taq mastermix (2x) (10 µL); Môi xuôi (10 pmol) (1 µL); Môi ngược (10 pmol) (1 µL); nước cất khử ion, khử trùng (7 µL). Chu kỳ nhiệt phản ứng PCR nhân gen *cry3Ca1*: biến tính (94°C/5 phút), 30 chu kỳ phản ứng: biến tính (94°C/30 giây), gắn mồi (58°C/30 giây), kéo dài chuỗi (72°C/1 phút), hoàn thiện kéo dài chuỗi (72°C/10 phút), kết thúc phản ứng, lưu giữ mẫu (4°C).

Phương pháp lai Southern: Các dòng cây khoai lang chuyển gen sau khi cho kết quả dương tính với phản ứng PCR được trồng ra ngoài trại thực nghiệm. Khi cây sinh trưởng phát triển tốt, thu lá để tách ADN tổng số và thực hiện phản ứng lai Southern. 30–50 µg

DNA tổng số được tách chiết từ 1 g lá khoai lang được tinh sạch và xử lý bằng enzyme *Bam*HI. Các phân đoạn DNA được phân tách trên gel agarose 1% và chuyển sang màng Nilon tích điện dương. Màng sau đó được lai với mẫu dò được tổng hợp nhờ bộ Kit Biotin DecaLabel DNA Labeling Kit (Thermo Scientific) với đoạn dò là sản phẩm PCR của gen chuyển *cry3Ca1*. Nhiệt độ lai 42°C (với dung dịch lai chứa 50% formamid và NaCl 1M) và rửa màng ở 65°C (0,1X SSC). Quy trình hiện màng được thực hiện theo kit Biotin Chromogenic Detection Kit (Thermo Scientific).

Đánh giá khả năng kháng bọ hà của các cây khoai lang chuyển gen: theo phương pháp của Phạm Bích Ngọc và nnk. (2015). Các dòng khoai lang chuyển gen được trồng ngoài nhà lưới tại Trại thực nghiệm sinh học Cổ Nhuế. Sau khoảng 100 ngày thu hoạch củ và đánh giá tính kháng bọ hà của củ các cây khoai lang này. Xác định hai chỉ tiêu sau: (1) Mức độ gây hại của bọ hà đối với củ khoai lang (Pondered degree of infestation, PDI) và (2) Tỷ lệ phần trăm gây hại (Percent of infestation, I):

$$I = S(a,b).100/D(n)$$

$$PDI = S(a/n)(b)$$

a: giá trị quy mô thiệt hại (1 – 4). Quy mô này đề cập đến phần trăm củ bị hư hại. Giá trị 1 dành cho củ bị ảnh hưởng bởi bọ hà tới 25%; Giá trị 2: củ bị ảnh hưởng từ 25% đến 50%; giá trị 3: củ bị ảnh hưởng từ 50% đến 75%; và 4 khi thiệt hại cao hơn 75%; *b:* số củ ở mỗi giá trị thang đo; *n:* tổng số củ; *D* = 4 (giá trị lớn nhất của thang đo)

Phương pháp xử lý số liệu: Các số liệu được

xử lý bằng phần mềm tin học Microsoft Excel và trình ứng dụng Statgraphics centurion XVI. Các giá trị trung bình theo sau bởi các chữ cái khác nhau (a, b) trong cùng một cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê theo phép kiểm định Duncan với $p < 0,05$.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

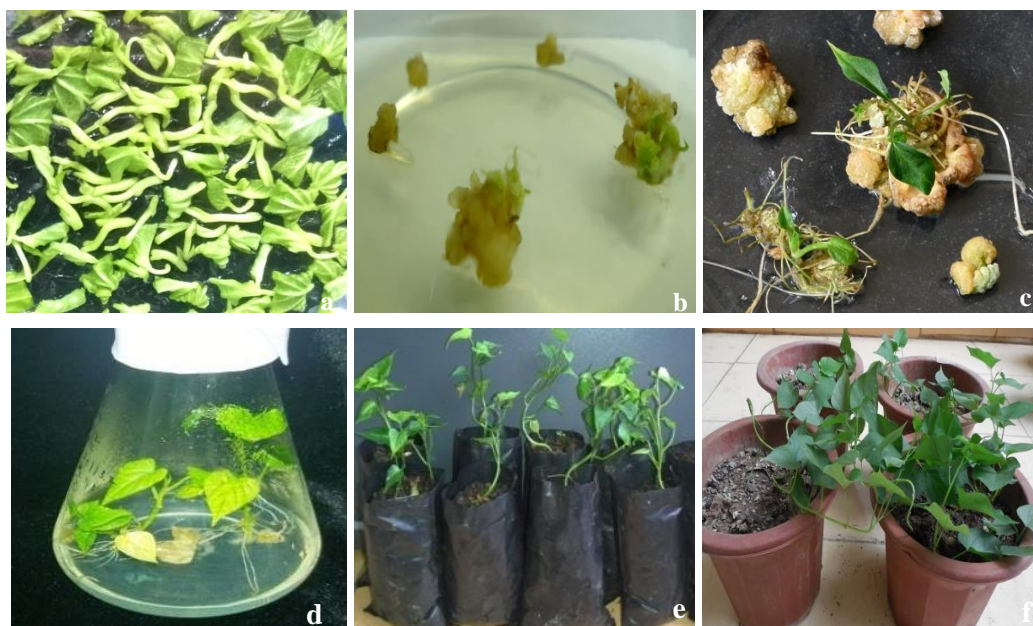
Chuyển gen *cry3Ca1* vào khoai lang thông qua *A. tumefaciens*

Để tạo các cây khoai lang chuyển gen, chủng *A. tumefaciens* C58 chứa gen *cry3Ca1* đã được sử dụng để biến nạp vào giống khoai lang KB1. Cấu trúc mang gen *cry3Ca1* đã được biến nạp vào nguồn nguyên liệu là đỉnh chồi và mảnh lá với 7 lô thí nghiệm (bảng 1, hình 2). Trên các môi trường chọn lọc, ban đầu mẫu sùi mô sẹo tốt, nhưng sau khoảng 30 ngày nuôi cấy, đa phần mô sẹo hình thành không sinh trưởng được, bị thâm đen và chết. Tỷ lệ mô sẹo bị chết khá cao, sau 2–3 lần cấy chuyển chỉ còn lại một số mô sẹo sống sót và chuyển lên môi trường tái sinh, đạt 38,87% (1345/3460). Các mô sẹo sống sót sinh trưởng tạo khối mô khá to ở một vài vị trí trên mẫu cấy, mô sẹo có màu trắng đến vàng nhạt. Sau khoảng 30–40 ngày, các mô sẹo sống sót được cấy chuyển sang môi trường cảm ứng phôi và tái sinh chồi. Khi chuyển các chồi tái sinh lên môi trường ra rễ chọn lọc thu được 62/145 (42,75%) cây chuyển gen ra rễ ở môi trường có nồng độ kanamycin 100 mg/L. Hiệu suất tái sinh cây chuyển gen đạt tỉ lệ 1,79%. Còn ở lô đối chứng, mẫu sau khi cắt không được nhiễm khuẩn nhưng được cấy lên các môi trường chọn lọc giống như thí nghiệm chuyển gen, kết quả nuôi cấy cho thấy ở giai đoạn đầu các mảnh cắt vẫn tạo mô sẹo, tuy nhiên, hầu hết các mẫu này bị vàng rồi chết sau khoảng 30 ngày.

Bảng 1. Kết quả chuyển cấu trúc mang gen *cryCa1* vào giống khoai lang KB1

Lô thí nghiệm	Số mẫu	Số mô sống sót trên MTCL			Số mô sẹo tái sinh	Số chồi tái sinh	Số chồi ra rễ trên MTRR
		SM	EG2	RM			
1	200	200	146	50	9	10	6
2	300	300	215	96	10	14	8
3	600	520	227	150	18	23	8
4	540	436	201	128	18	22	7
5	620	523	195	141	21	30	10
6	580	517	176	145	19	27	12
7	620	563	185	128	15	19	11
Tổng	3460	3059	1345	838	110	145	62
ĐC	50	50	15	0	0	0	0

ĐC: mẫu không nhiễm *Agrobacterium* nuôi cấy trên MTCL; MTCL: môi trường chọn lọc gồm SM, EG2, RM bổ sung 50 mg/L Km; MTRR: môi trường ra rễ bổ sung 100 mg/L Km



Hình 2. Một số hình ảnh chuyển *cry3Ca1* vào giống khoai lang KB1: a) Mẫu trên môi trường đồng nuôi cây; b) Mô sẹo trên môi trường chọn lọc SM; c) Chồi tái sinh trên môi trường chọn lọc RM; d) Cây khoai lang chuyển gen ra rễ trên môi trường RR; e, f) Cây khoai lang chuyển gen ra cây trồng trong bầu và chậu ở nhà lưới

Việc xây dựng hệ thống tái sinh cây khoai lang chuyển gen đích (gen *cry3*) thành công đã được Mora'n et al. (1998) báo cáo. Cấu trúc mang gen *cry3* đã được biến nạp vào 45 mảnh lá giống khoai lang Jewell, qua các bước chọn lọc và tái sinh đã thu được 14,75/32 cây chuyển gen ra rễ trên môi trường kháng sinh (chiếm 33%). Sự tái sinh và chọn lọc chồi được thực hiện trên môi trường chọn lọc bổ sung kanamycin 25 mg/L và tổ hợp hoocmôn NAA 1 mg/L và BAP 0,2 mg/L. Sau đó, các chồi hình thành được cấy lên môi trường MS bổ sung Km với nồng độ 50 mg/L, cefotaxime 500 mg/L.

Phân tích các dòng khoai lang chuyển gen

Phân tích bằng kỹ thuật PCR

Lá của 62 dòng khoai lang chuyển gen và dòng không chuyển gen trồng ở nhà lưới được thu để tách chiết DNA tổng số và tiến hành phản ứng PCR nhân gen *cry3Ca1* với cặp mồi đặc hiệu *cry3Calop_F/R* (hình 3). Kết quả điện di sản phẩm phản ứng PCR cho thấy, 7 dòng khoai lang chuyển gen (giếng số 3, 4, 8, 9, 14, 16, 17) xuất hiện băng DNA có kích thước khoảng 800 bp đúng với kích thước lí thuyết của gen *cry3Ca1*. Điều này chứng tỏ 7 dòng khoai lang này đã mang gen chuyển *cry3Ca1*.



Hình 3. Kết quả điện di sản phẩm PCR kiểm tra sự có mặt của gen *cry3Ca1* của các dòng khoai lang chuyển gen: M: thang DNA chuẩn 1 kb, Fermentas; (+): Đối chứng dương (plasmid mang gen chuyển); (-): Đối chứng âm: cây không chuyển gen; làn chạy 1-20: các cây khoai lang chuyển gen *cry3Ca1*

Phân tích bằng kỹ thuật Southern Blot

Bảy dòng khoai lang dương tính khi phân tích PCR được phân tích tiếp theo bởi kỹ thuật

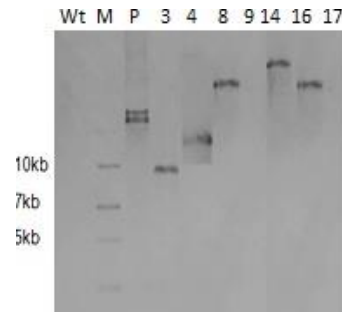
lai Southern (hình 4). Kết quả thu được cho thấy có 5 dòng khoai lang biểu hiện dương tính với 1 băng tương ứng với 1 bản sao gen chuyển trong

genome (dòng số 3, 4, 8, 14, 16). Kích thước của các băng không đồng đều, cho thấy vị trí gắn của gen chuyển trong genome khác nhau. Dòng không chuyển gen cho kết quả âm tính. Sự biểu hiện của gen ngoại lai ở thực vật để kháng được côn trùng gây hại là giải pháp thay thế thích hợp trong bảo vệ thực vật. Hai gen mã hóa cho các chất ức chế trypsin (cowpea trypsin inhibitor-CTI) và snowdrop lectin-GNA) đã được chọn lọc và chuyển vào giống khoai lang Jewel thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* LBA4404 để tạo ra tính kháng với bọ hà. Sáu dòng cây chuyển gen thu được biểu hiện hoạt tính của enzyme β -Glucuronidase và các protein CTI và GNA. Sáu dòng chuyển gen *CTI* được khẳng định bằng phương pháp lai Southern, trong đó 2 dòng mang một bản copy và 1 dòng mang ba bản copy của gen, 3 dòng chưa xác định được số copy (Newell et al., 1995).

Đánh giá khả năng kháng bọ hà của các cây khoai lang chuyển gen

Củ của ba dòng khoai lang chuyển gen *cry3Ca1* được nghiên cứu (kí hiệu C1, C2, C3) khi thu về được rửa sạch đất cát, để cho khô bề mặt và tiến hành thí nghiệm đánh giá

khả năng kháng bọ hà ở điều kiện phòng thí nghiệm (bảng 2). Kết quả lây nhiễm bọ hà ở điều kiện phòng thí nghiệm cho thấy mức độ gây hại của bọ hà (PDI) đối với củ của ba dòng cây chuyển gen này đều thấp hơn so với củ của dòng đối chứng trong từng lô thí nghiệm (với $p < 0,05$), trong đó 2 cây chuyển gen là C2 và C3 có PDI thấp hơn 1,31 đến 1,35 lần so với đối chứng. Đồng thời, tỉ lệ phần trăm gây hại (I) của củ khoai lang của ba dòng chuyển gen đều thấp hơn so với đối chứng từ 7,5% đến 16,6%.



Hình 4. Kết quả lai Southern kiểm tra các dòng khoai lang chuyển gen *cry3Ca1*: P: vector chuyển gen mang gen *cry3Ca1*; Wt: đối chứng không chuyển gen; 3, 4, 8, 9, 16, 17: các dòng chuyển gen dương tính khi phân tích PCR

Bảng 2. Đánh giá khả năng kháng bọ hà của các cây khoai lang KB1 chuyển gen *cry3Ca1*

Đợt thí nghiệm	Dòng khoai lang CG	Khối lượng củ (g)	Số củ	PDI	PDI dòng CG giảm so với ĐC (lần)	I (%)	I của dòng CG giảm so với ĐC (%)	Mức độ phát triển của bọ hà
Đợt 1	C1	47,48	5	2,50 ^a	1,12	62,5 ^a	7,50	T1
	ĐC	134,35	10	2,80 ^b	-	70,0 ^b	-	T1-T2
Đợt 2	C2	60,50	4	1,70 ^a	1,35	41,7 ^a	16,6	T1
	C3	67,75	5	1,80 ^a	1,31	43,8 ^a	14,6	T1
	ĐC	152,77	10	2,30 ^{ab}	-	58,3 ^{ab}	-	T1-T2

PDI: Mức độ phá hại của bọ hà đối với củ khoai lang; I: Tỉ lệ bị nhiễm bọ hà của củ khoai lang; CG: chuyển gen; ĐC: không chuyển gen; T1: sâu non tuổi 1; T2: sâu non tuổi 2; (-): không so sánh, n = 2. a, b: trong cùng một cột biểu thị sự sai khác có ý nghĩa thống kê theo phép kiểm định Duncan với $p < 0,05$

Trong các nghiên cứu trước, chúng tôi đã thu được hai cây chuyển gen *vip2-1* và 2 cây chuyển gen *cry8Db* có mức độ gây hại bởi bọ hà thấp hơn rõ rệt so với đối chứng. PDI của hai cây chuyển gen *vip2-1* thấp hơn từ 1,33 đến 1,40 lần (Vũ Thị Lan và nnk., 2015), PDI của hai cây khoai lang chuyển gen *cry8Db* thấp hơn từ 1,53 đến 1,73 lần so với cây đối chứng không chuyển gen (Pham Bích Ngọc et al., 2015). Cho đến nay, rất ít các công bố tạo cây khoai lang chuyển gen kháng bọ hà trên thế giới, chỉ có duy nhất ba công trình liên quan đến việc tạo ra

các cây khoai lang Jewel chuyển gen kháng bọ hà. Newell et al. (1995) đã phân tích các cây khoai lang Jewel chuyển gen *CTI* và *GNA*. Cây chuyển gen thu được biểu hiện hoạt tính của enzyme β -Glucuronidase và các protein ức chế Cowpea trypsin và Snowdrop lectin, tuy nhiên các nhà khoa học không đưa ra các dẫn liệu liên quan đến tính kháng côn trùng ở các cây chuyển gen. Morán et al. (1998) đã đánh giá tính kháng với bọ hà của các cây chuyển gen dưới điều kiện nhà lưới đã thu được hai cây chuyển gen C27 và C1 biểu hiện sự kháng với bọ hà cao

hơn so với các cây đối chứng. Trong thí nghiệm này, sự thiệt hại trong củ của các cây C1 và C27 ít hơn gần 2–5 lần so với cây đối chứng. Gracia et al. (2000) đã nghiên cứu tổ hợp các chất điều hòa sinh trưởng để lựa chọn thành phần môi trường phù hợp cho tái sinh cây khoai lang chuyển gen *cry3A* vào giống khoai lang Jewel để kháng bọ hà khoai lang, tuy nhiên, mức độ biểu hiện protein ở các cây chuyển gen thu được rất thấp. Nhóm tác giả này cho rằng một trong những nguyên nhân chủ yếu do gen *Bt* chưa được tối ưu mã trước khi sử dụng chuyển gen thực vật.

KẾT LUẬN

Cấu trúc mang gen *cry3Ca1* đã được biên nạp thành công vào giống khoai lang KB1 để tạo tính kháng bọ hà. Các cây chuyển gen được phân tích bằng các kỹ thuật sinh học phân tử hiện đại và đã có các phân tích ban đầu về tính kháng bọ hà ở điều kiện phòng thí nghiệm. Các kết quả nghiên cứu thu được đã mở ra triển vọng cải biến di truyền ở cây khoai lang Việt Nam.

Lời cảm ơn: Công trình được hỗ trợ về kinh phí và trang thiết bị từ Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Anwar N., Junko K., Watarabe A., 2011. Transgenic sweet potato expressing mammalian cytochrome P450. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 105: 219–231.
- García R., Morán R., Mena J., Somontes D., Zaldúa Z., López A., García M., 2000. Sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) regeneration and transformation technology to provide weevil (*Cylas formicarius*) resistance. In: Arencibia A. D. (ed) *Flied trial results: Plant genetic Engineering*, Elsevier Science B. V., 112–117.
- Garvel N. J., Jarret R. L., 1991. A modified CTAB DNA extraction procedure for *Muss* and *Ipomoea*. *Plant Mol Biol Rep*, 9: 262–266.
- Mitchell T. D., Bhagsari A. S., Ozias-Akins P., Dhir S. K., 1998. Electro poration-mediated transient gene expression in intact cells of sweetpotato. *In Vitro Plant*, 34(4): 319–324.
- Mora'n R., Garc'ia R., Lo'pez A., Zaldu'a Z., Mena J., Garc'ia M., Armas R., Somonte D., Rodr'iguez J., Go' mezm M., Pimentel E., 1998. Transgenic sweet potato plants carrying the delta-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. *Plant Sci.*, 139: 175–184.
- Newell C. A., Lowe J. M., Merryweather A., Rooke L. M., Hamilton W. D. O., 1995. Transformation of sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) with *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration of plants expressing cowpea trypsin inhibitor and snowdrop lectin. *Plant Sci*, 107(2): 215-227.
- Okada Y., Saito A., 2009. Evaluation of resistance to complex infection of SPFMVs in transgenic sweet potato (*Ipomoea batatas*). *Breed Sci (Jpn)*, 58(3): 243-250.
- Otani M., Wakita Y., Shimada T., 2003. Production of herbicide-resistant sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) plants by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Breed Sci*, 53: 145–148.
- Pham Bích Ngọc, Vu Thi Lan, Tran Thu Trang, Nguyen Hoai Thuong, Le Thu Ngoc, Chu Hoang Ha, Le Tran Binh, 2015. *Agrobacterium*-mediated transformation of *cry8Db* gene in Vietnam sweet potato cultivar. *Journal of Life Science*, 9: 262–271.
- Phạm Bích Ngọc, Nguyễn Đình Trọng, Lê Thu Ngọc, Chu Hoàng Hà, Lê Trần Bình, 2012. Thiết kế các vector mang gen độc tố diệt bọ cánh cứng sử dụng trong chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. *Tạp chí khoa học, Trường Đại học sư phạm Hà Nội*, 2(21): 191–197.
- Shimada T., Otani M., Hamada T., Kim S. H., 2006. Increase of amylose content of sweet-potato starch by RNA interference of the starch branching enzyme II gene (*IbSBEII*). *Plant Biotechnology*, 23: 85–90.
- Sivparsad B. J., Gubba A., 2014. Development of transgenic sweet potato with multiple virus resistance in South Africa (SA). *Transgenic Research*, 23(2): 377–388.
- Vũ Thị Lan, Phạm Bích Ngọc, Lê Thu Ngọc, Nguyễn Thị Hoài Thương, Trần Thu Trang, Nguyễn Văn Đoàn, Chu Hoàng Hà, Lê Trần Bình, 2015. Nghiên cứu tạo cây khoai lang

- chuyển gen mang cấu trúc gen vip2-1 thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*. Tạp chí Công nghệ Sinh học, 13(4): 1091–1099.
- Wakita Y., Otani M., Hamada T., Mori M., Iba K., Shimada T., 2001. A tobacco microsomal α -3 fatty acid desaturase gene increases the linolenic acid content in transgenic sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.). Plant Cell Rep, 20: 244–249.
- Yi G., Shin Y. M., Choe G., Shin B., Kim Y. S., Kim K. M., 2007. Production of herbicide - resistant sweet potato plants transformed with the bar gene. Biotechnol Lett, 29: 669–675.
- Yu B., Zhai H., Wang Y., Zang N., Wang Y., Liu Q., 2007. Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation using embryogenic suspension cultures in sweet potato, *Ipomoea batatas* (L.) Lam. Plant Cell Tiss Organ Cult, 90: 265–273.

AGROBACTERIUM-MEDIATED TRANSFORMATION OF *CRY3CA1* GENE INTO KB1 SWEET POTATO CULTIVAR

Vu Thi Lan¹, Pham Bich Ngoc², Chu Hoang Ha², Le Tran Binh^{2*}

¹Thainguyen University of science, Thai Nguyen University

²Institute of Biotechnology, VAST

SUMMARY

Sweet potato *Ipomoea batatas* (L.) Lam is an important food crop in the world as well as in Vietnam. Despite its many benefits, the production of sweet potato is restricted in many areas of the world by diseases, weed, and, particularly, pests. As an alternative, genetic transformation provides the means for complementing conventional breeding to improve sweet potato to resistant to pest. In this study, shoot tip explants of KB1 sweet potato variety were infected with *A. tumefaciens* C58 carrying pBI101/*cry3Cal* construct. The selection were occurred on callus producing medium (SM) containing 0.5 g/L picloram, 50 mg/L kanamycin and 500 mg/L cefotaxime. Survival embryogenic calli were then transferred to embryo producing medium (EG2) supplemented with 1.0 mg/L ABA and 1.0 mg/L GA₃ after 2–3 weeks. Putative transgenic shoots regenerated on medium (RM) adding 0.5 mg/L kinetin and 1.0 mg/L BAP were rooted on root producing medium (RR). The tentative transgenic lines were proved positively by PCR and finalized by Southern hybridization, and biotest in laboratory. Conclusionly, we obtained 62 tentative transgenic sweet potato lines resistant to kanamycin. Among these lines, five putative transgenic lines were proved positively by Southern hybridization and have one copies of the *cry3Cal* gene. Two of them have the lower degree of infestation by sweet potato weevil (*Cylas formicarius*) than that of untransformed lines.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*, *Ipomoea batatas* L., *Cry3Cal* gene, plant transformation, sweet potato weevil.

Citation: Vu Thi Lan, Pham Bich Ngoc, Chu Hoang Ha, Le Tran Binh, 2018. Agrobacterium-mediated transformation of *Cry3Cal* gene into KB1 sweet potato cultivar. Tap chí Sinh học, 40(2): 252–258. <https://doi.org/10.15625/0866-7160/v40n2.12844>.

*Corresponding author email: lanvt@tnus.edu.vn

Received 20 July 2018, accepted 30 October 2018