

## CHUYỂN GEN *SHRUNKEN 2 (Sh2)* MÃ HÓA ENZYME ADP-GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE VÀO MỘT SỐ DÒNG NGŨ BẰNG PHƯƠNG PHÁP CHUYỂN GEN THÔNG QUA *Agrobacterium tumefaciens*

Trần Thị Lương, Nguyễn Thị Thu, Nguyễn Thùy Ninh, Nguyễn Đức Thành\*

Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam, \*nguyenducthanh\_pcg@ibt.ac.vn

**TÓM TẮT:** Gen *Shrunken 2 (Sh2)* đã được xác định tham gia vào quá trình sinh tổng hợp tinh bột vì gen này mã hóa cho hai tiểu phần lớn của enzyme ADP-glucose pyrophosphorylase, một enzyme đóng vai trò quan trọng trong điều hòa sinh tổng hợp tinh bột ở nhóm cây ngũ cốc. Mục đích của nghiên cứu này là chuyển gen *Sh2* vào một số dòng ngô trồng và tái sinh cây chuyển gen mang gen đích phục vụ cho nghiên cứu vai trò của gen *Sh2* trong việc tăng cường tổng hợp tinh bột ở cây ngô. Các chủng *Agrobacterium tumefaciens* C58 và DHA105 mang vector chuyển gen pCambia1301/Ubi/Sh2 có chứa gen *Sh2* và chuỗi khởi động Ubiquitin đặc thù cho cây một lá mầm được sử dụng để chuyển gen *Sh2* vào phôi non của các dòng ngô. Phản ứng PCR nhân bản gen *Ubi* và *Sh2* được tiến hành để kiểm tra sự có mặt của gen chuyển trong cây chuyển gen T0. Lai Southern và Northern được tiến hành ở các cây chuyển gen tương ứng T0 và T1 để kiểm tra sự thâm nhập vào hệ gen và sự thể hiện của gen *Sh2* ở các cây chuyển gen. Đã tái sinh được cây từ các mô sẹo chuyển gen của sáu dòng ngô H95, H240, H26, H14, H4 và CML161 với hiệu suất chuyển gen từ 1,08 đến 1,77. Chủng *A. tumefaciens* DHA105 cho hiệu suất chuyển gen cao hơn chủng C58 và đạt từ 1,60 đến 4,31%. Các cây chuyển gen có từ 1 đến 3 bản sao gen chuyển nạp. Nhiều cây chuyển gen sinh trưởng và phát triển bình thường, cho bắp và hạt. Việc nghiên cứu ảnh hưởng của gen chuyển đến sinh tổng hợp tinh bột ở các dòng ngô chuyển gen sẽ được tiến hành trong thời gian tới.

**Từ khóa:** *Agrobacterium tumefaciens*, cây chuyển gen, dòng ngô, gen *Shrunken 2 (Sh2)*, hiệu suất chuyển gen.

### MỞ ĐẦU

Ngô (*Zea mays* L.) là cây ngũ cốc quan trọng thứ ba trên thế giới, diện tích gieo trồng trên phạm vi toàn cầu vào khoảng 400 triệu ha với sản lượng 600 triệu tấn/năm. Ngô góp phần vào việc ổn định sản lượng ngũ cốc trên thế giới và có vai trò quan trọng trong kinh tế và thương mại quốc tế như là một cây trồng sử dụng làm thực phẩm, thức ăn chăn nuôi và sản xuất công nghiệp. Nhu cầu về lương thực, thức ăn chăn nuôi và nhiên liệu trên thế giới ngày một tăng, theo tính toán, hàng năm phải sản xuất thêm 200 triệu tấn ngô và lúa mì mới đủ yêu cầu vào 2017 [5]. Năng suất ngô ở Hoa Kỳ đã tăng từ 1,9 tấn/ha vào những năm 30 của thế kỷ trước đến 10,34 tấn/ha hiện nay [5]. Sự tăng năng suất này là nhờ sử dụng các công nghệ canh tác như: ưu thế lai, phân bón tổng hợp và cơ giới hóa. Sử dụng công nghệ gen và các phương pháp chọn lọc bằng chỉ thị DNA là những cách tiếp cận mới để tăng năng suất ngô. Khoảng 50% tăng năng suất là do cơ giới hóa, chăm sóc và mật độ

trồng, còn lại 50% là do cải biến di truyền [4]. Nhìn chung, ngoài Hoa Kỳ, năng suất ngô ở các nước sản xuất chính như Trung Quốc, Brazil, Ấn Độ, Mexico, Argentina đều thấp (từ 2,06 đến 5,35 tấn/ha), năng suất ngô trung bình của thế giới chỉ đạt 5,12 tấn/ha [22]. Chính vì vậy, việc ứng dụng công nghệ sinh học, đặc biệt là công nghệ gen để cải tiến năng suất ở ngô là rất cần thiết.

Để tăng năng suất, một trong những cách tiếp cận là tăng năng suất hạt. Enzyme ADP-glucose pyrophosphorylase (AGP) là enzyme có cấu trúc tứ phân tử nhiều phân tử khác nhau, xúc tác cho mức độ tổng hợp tinh bột và được biết đến như là enzyme then chốt trong điều khiển sức chứa. Biến đổi gen này có thể làm tăng sức chứa của cây và sau đó là tăng năng suất sinh khối và năng suất hạt.

Quá trình tổng hợp tinh bột được bắt đầu bằng enzyme ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase) xúc tác cho phản ứng glucose-1-

phosphate với ATP để tạo ADP-glucose. ADP-glucose sau đó sử dụng như chất nền, dưới sự tham gia của các enzyme tổng hợp tinh bột (starch synthase enzymes) bổ sung thêm các phân tử đường glucose vào đầu kéo dài của sợi polymer xây dựng nên phân tử tinh bột và giải phóng ADP. Sự tạo nhánh tinh bột được thực hiện bằng các enzyme phân nhánh (starch branching enzymes-SBEs), bằng thủy phân khung 1,4-glycosidic và tạo khung 1,6 với các phân tử glucose khác. Với hoạt động của enzyme phân nhánh tinh bột (starch branching enzyme IIB) mã hóa bởi gen *ael* và enzyme đóng nhánh (debranching enzyme) mã hóa bởi gen *sul*, ADP glucose chuyển thành amylopectin; trong khi sự hoạt động của enzyme xúc tác tạo hạt tinh bột (granule-bound starch synthase) mã hóa bởi gen *wx1* thì ADP glucose chuyển thành amylase. Hoạt động của ADP-glucose pyrophosphorylase nội nhũ kích thích sự tạo thêm hạt và sinh trưởng tổng thể góp phần vào tăng năng suất [19]. Lohot et al. (2010) [11] thông báo có sự tương quan giữa hoạt động của ADP-glucose pyrophosphorylase với sự tích lũy tinh bột trong hạt lúa mì ở điều kiện gieo trồng bình thường.

Gen *Sh2* mã hóa cho hai tiểu phần lớn của ADP-glucose pyrophosphorylase và ít thay đổi trong quá trình tiến hóa [12]. Đây là gen quan trọng, thể hiện ở nội nhũ, vì vậy, có ảnh hưởng rất nhiều đến tổng hợp tinh bột. Ở ngô, gen *Sh2*

nguyên thủy có vùng mã hóa gồm 1913 nucleotides [17] và nằm trên nhiễm sắc thể 3L và chỉ thể hiện ở nội nhũ bắp ngô. Bhave et al. (1990) [1] đã xác định được cDNA gen *Sh2* và cũng đã chứng minh *Sh2* mã hóa cho tiểu phần ADP-glucose pyrophosphorylase nội nhũ. Gen *Sh2* đã được chuyển vào cây lúa mì [18], lúa [19] và ngô [10] và đã cho thấy sự gia tăng hoạt động của ADP-glucose pyrophosphorylase, kéo theo sự tăng năng suất hạt.

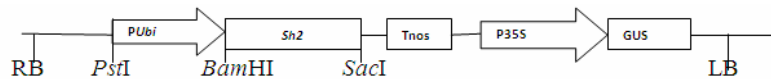
Mục đích của nghiên cứu này là chuyển gen *Sh2* vào một số dòng ngô và tạo cây ngô chuyển gen mang gen đích góp phần cho các nghiên cứu tiếp theo về vai trò của gen này trong việc tăng cường tổng hợp tinh bột ở cây ngô.

#### VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Mười hai dòng ngô bao gồm: N18; H64; H54; H26; HIL9; H240; H14; H4; H95; H20; H21 và CML161 sử dụng trong nghiên cứu này do Viện Nghiên cứu ngô cung cấp.

Phôi non có kích thước từ 1-2 mm được tách từ hạt ngô 10 đến 20 ngày tuổi sau khi thụ phấn.

Vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*: hai chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* EHA105 và C58 mang vector biểu hiện pCambia/Ubi/Sh2 chứa gen *Sh2* được điều khiển bằng chuỗi khởi động Ubiquitin (hình 1).



Hình 1. Sơ đồ cấu trúc vector biểu hiện Cambia/Ubi/Sh2 [21].

Các môi trường nuôi cấy mô bao gồm: A1: N6 (Chu et al., 1975) [2] + 2 mg/l 2,4-D, 10 mg/l AgNO<sub>3</sub>, 1,15 g/l L-proline, 100 mg/l casein hydrolysate, 20 mg/l sucrose, 10 g/l glucose, 100 µM acetosyringone (môi trường lây nhiễm và đồng nuôi cấy); A2: N6 + 2 mg/l 2,4-D, 10 mg/l AgNO<sub>3</sub>, 1,15 g/l L-proline, 100 mg/l casein hydrolysate, 20 mg/l sucrose, 10 g/l glucose, 500 mg/l cefotaxime, 10-20 mg/l hygromycin (môi trường chọn lọc lần 1); A3: N6 + 2 mg/l 2,4-D, 10 mg/l AgNO<sub>3</sub>, 1,15 g/l L-proline, 100 mg/l casein hydrolysate, 20 mg/l

sucrose, 10 g/l glucose, 150 mg/l cefotaxime, 10-20 mg/l hygromycin (môi trường chọn lọc lần 2); A4: N6 + 2 mg/l 2,4-D, 10 mg/l AgNO<sub>3</sub>, 1,15 g/l L-proline, 100 mg/l casein hydrolysate, 20 mg/l sucrose, 10 g/l glucose (môi trường phục hồi); A5: N6 + 2 mg/l BAP hoặc kinetin + 60 g/l đường sucrose (môi trường tái sinh) A6: ½ N6 + 0,5 mg/l NAA + 30 g/l đường sucrose (môi trường tạo rễ).

#### Phương pháp

Phương pháp chuyển gen *Sh2* vào cây ngô thông qua vi khuẩn *Agrobacterium* được tiến

hành dựa trên phương pháp của Frame et al. (2002) [7] với một số cải tiến cụ thể là:

#### *Chuẩn bị nguyên liệu chuyển gen*

Bắp non được thu sau thụ phấn từ 10 đến 20 ngày, bóc bỏ 3-5 lớp vỏ ngoài bắp, mỗi lần bóc một lớp cần khử trùng bề mặt bắp ngô bằng cồn 70%. Cắt bỏ phần phía đầu râu ngô, để lại khoảng 4-5 lớp vỏ ngoài bao lấy bắp, cho bắp đã được khử trùng bề mặt vào tủ lạnh 4°C trong 1-2 ngày. Sau đó bắp sẽ được dùng để tách phôi.

Phôi được tách trong điều kiện vô trùng. Tách hạt khỏi bắp ngô và dùng dao cắt một phần nhỏ của hạt phía có dây treo phôi, tránh cắt ngang phôi, bóp nhẹ để đẩy phôi tách ra khỏi hạt.

#### *Chuẩn bị dịch huyền phù vi khuẩn*

Nuôi chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* EHA105 trên môi trường LB đặc có bổ sung kanamycin (50 mg/l) và rifamicin (25 mg/l) và chủng *A. tumefaciens* C58 trên môi trường LB đặc có bổ sung kanamycin (50 mg/l) và rifamicin (50 mg/l) trong tủ ôn nhiệt 28°C, trong 48 giờ. Chọn khuẩn lạc mọc trên môi trường LB thạch và nuôi cấy trong LB lỏng với chế độ lắc 2.000 v/p ở 28°C trong 16 giờ. Lấy dung dịch nuôi lỏng lần 1 này (1 ml dung dịch khuẩn) nuôi trong 10 ml LB lỏng có bổ sung kháng sinh kanamycin và rifamicin. Ly tâm dung dịch nuôi lỏng lần 2, loại bỏ dịch nổi rồi hòa tan cặn trong môi trường MS (Murashige & Skoog, 1962) [13] lỏng có bổ sung 100 µM acetosyringone và pha loãng dịch đến OD<sub>660nm</sub> đạt 0,6-0,8.

#### *Nhiễm khuẩn và đồng nuôi cấy*

Phôi non được ngâm trong dịch huyền phù vi khuẩn 20 đến 30 phút, sau đó thấm khô và cấy trên môi trường đồng nuôi cấy A1, trong tối, 3 đến 4 ngày.

#### *Diệt khuẩn, nuôi cấy và chọn lọc mô sẹo chuyển gen*

Phôi sau khi gây nhiễm và đồng nuôi cấy được rửa bằng dung dịch cefotaxime 500 mg/l. Sau khi rửa, thấm phôi bằng giấy thấm và cấy trên môi trường chọn lọc A2 chứa 10 đến 20 mg/l hygromycin. Sau 1 tuần, chuyển phôi sang môi trường chọn lọc A3 với 150 mg/l

cefotaxime và 10 đến 20 mg/l hygromycin để chọn lọc mô sẹo chuyển gen. Sau một tuần nuôi cấy, chọn các mô sống sót chuyển sang môi trường phục hồi A4 (N6 + 2 mg/l 2,4-D; 10 mg/l AgNO<sub>3</sub>; 1,15 g/l L-proline; 100 mg/l casein hydrolysate; 20 g/l sucrose; 10 g/l glucose) và nuôi cấy trong tối để callus đạt kích thước lớn hơn.

#### *Tái sinh cây từ mô sẹo chuyển gen, tạo rễ và đưa cây ra đất*

Các mô sẹo sau khi xử lý chuyển gen và chọn lọc được đưa vào môi trường tái sinh A5 (môi trường N6 có bổ sung chất điều hòa sinh trưởng BAP hoặc kinetin 2,0 mg/l; sucrose 60 g/l; 7,5 g/l agar; pH 5,8) và nuôi trong điều kiện 28°C, ánh sáng 8 giờ/ngày, sau 3 đến 4 tuần chồi được tạo thành. Sau khi chồi được tái sinh sẽ chuyển sang môi trường tạo rễ A6 (môi trường là 1/2 N6 bổ sung NAA hoặc IBA từ 0,5 mg/l; 30 g/l sucrose; 7,5 g/l agar; pH 5,8) và nuôi trong điều kiện 28°C, ánh sáng 8 giờ/ngày. Sau 2 đến 3 tuần chồi được tạo rễ đầy đủ.

Cây con hoàn chỉnh sẽ được cho ra huấn luyện ở bầu nhựa mỏng với giá thể Tribat (Công ty TNHH Công nghệ sinh học Sài Gòn xanh) có chứa đầy đủ các thành phần dinh dưỡng, muối khoáng cần thiết cho sự sinh trưởng, phát triển của cây. Sau 7 đến 10 ngày huấn luyện, các cây được đưa trồng ra nhà lưới.

#### *Kiểm tra sự có mặt của các gen Ubi, Sh2 trong cây chuyển gen bằng PCR.*

Để kiểm tra sự có mặt của promoter Ubiquitin trong các cây ngô chuyển gen, cặp mồi đặc hiệu cho gene *Ubi* UbiSF: 5'-TACTGCAGGTGCAGCGTGACCCG-3' và UbiSR: 5'-TAGGATCCTGCAGAAGTAACA CCAAACAA-3' [20] được sử dụng để nhân bản gen *Ubi* từ DNA genome của các cây chuyển gen bằng phản ứng PCR. Thành phần phản ứng và thể tích 20 µl hỗn hợp phản ứng bao gồm dNTPs (1 mM) 4 µl, 10 x PCR buffer (-Mg<sup>2+</sup>, +KCl) 2 µl, MgCl<sub>2</sub> (25 mM) 1,2 µl, Taq DNA polymerase (5 U/µl) 0,1 µl, UbiSF (50 ng/µl) 1 µl, UbiSR (50 ng/µl) 1 µl, DNA (20 ng/µl) 1 µl. Chương trình PCR bao gồm: 94°C: 5 phút; 35 chu kỳ, mỗi chu kỳ gồm 94°C: 1 phút; 58°C: 50 giây; 72°C: 1 phút 30 giây; cuối

cùng là kéo dài ở 72°C 5 phút để kết thúc phản ứng.

Để kiểm tra gen *Sh2* trong các cây ngô chuyển gen, cặp mồi đặc hiệu cho gen *Sh2* ZmSh2F: 5'-5'-GCGGATCCGATATGCAGTTGCACTTGC-3' và ZmSh2R: 5'-5'-GCGAGCTCCTATATGACAGACCCATCGTTG-3' [21] được sử dụng để nhân bản gen *Sh2* từ DNA genome của các cây chuyển gen bằng phản ứng PCR. Thành phần phản ứng và chương trình PCR tương tự như đối với gen *Ubi*.

Sản phẩm PCR được điện di kiểm tra trên gel agarose 1%.

#### Kiểm tra gen chuyển nạp *Sh2* bằng lai Southern

Phương pháp thấm truyền Southern được tiến hành theo Sambrook et al. (1989) [15]: DNA genome (30 µg) của các cây chuyển gen đã được xác định dương tính bằng PCR được cắt bằng enzyme *Bam*HI và *Sac*I hoặc chỉ bằng *Sac*I và điện di trên gel agarose 0,8%. Gây biến tính DNA trên gel bằng dung dịch kiềm (NaOH 0,5 M; NaCl 1,5 M), sau đó chuyển các đoạn DNA từ bản gel lên màng lai nitrocellulose bằng thấm truyền Southern. Phân đoạn gen *Sh2* nhân bản bằng PCR (để làm đoạn dò) được đánh dấu bằng Biotin DecaLabel DNA Labeling Kit (Thermo Scientific) sử dụng Biotin-11-dUTP và tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Màng lai được đưa vào khay nhựa chứa dung dịch tiền lai (6xSSC, 5xDenhardt's buffer, 0,5% BSA, 50% deion formamide) và ủ trong 2 đến 4 giờ ở 42°C trên máy lắc. Sau đó bỏ dung dịch tiền lai, chuyển màng sang khay chứa sẵn dung dịch lai đã bổ sung DNA tinh dịch cá hồi và đoạn dò đã được đánh dấu, ủ mẫu ở 42°C qua đêm, lắc nhẹ. Rửa lại màng lai 2 lần trong dung dịch SSC 2x + SDS 0,1% trong 10 phút ở nhiệt độ phòng và 2 lần trong dung dịch SSC 0,1x + SDS 0,1% trong 30 phút ở 60°C. Đổ bỏ dung dịch, dùng giấy lọc làm khô màng lai. Việc xác định sự có mặt của gen *Sh2* chuyển nạp được tiến hành bằng Biotin chromogenic detection Kit theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Thermo Scientific).

#### Kiểm tra hoạt động gen chuyển nạp *Sh2* bằng lai Northern

RNA tổng số từ phôi các cây chuyển gen T1

của các dòng T0 đã được xác định dương tính bằng lai Southern được tách theo phương pháp xử dụng Trizol, sau đó điện di trên gel formaldehyde agarose 1% và thấm truyền lên màng nitrocellulose và lai với các đoạn dò *Sh2* đã được đánh dấu bằng Biotin DecaLabel DNA Labeling Kit (Thermo Scientific) sử dụng Biotin-11-dUTP và tiến hành theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Sau khi lai, màng lai được rửa hai lần trong dung dịch SSC 2x + SDS 0,1% trong 10 phút ở nhiệt độ phòng và 2 lần trong dung dịch SSC 0,1x + SDS 0,1% trong 30 phút ở 60°C. Đổ bỏ dung dịch, dùng giấy lọc làm khô màng lai. Việc xác định sự có mặt của gen *Sh2* chuyển nạp được tiến hành bằng Biotin chromogenic detection Kit theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Thermo Scientific).

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Chuyển gen *Sh2* và tạo cây ngô chuyển gen

#### Chọn mô sẹo chuyển gen

Việc xử lý phôi non của 12 dòng ngô với hai chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* C58 và EHA105 mang cấu trúc pCambia/Ubi/Sh2, và chọn lọc mô sẹo trên môi trường A2 và A3 được tiến hành trong vụ Xuân 2013 (tháng 3 đến tháng 6/2013). Kết quả chọn lọc mô sẹo chuyển gen được trình bày trong bảng 1.

Kết quả trong bảng 1 cho thấy, tỷ lệ mô sẹo chọn được sau chuyển gen bằng chủng *A. tumefaciens* EHA105 cao hơn chủng C58 với giá trị tương ứng là 13,16% và 11,98% tổng số mô sẹo chọn được từ các dòng ngô nghiên cứu trên tổng số phôi xử lý của các dòng ngô. Khi xử lý bằng chủng C58, tỷ lệ mô sẹo được chọn lọc của các dòng ngô dao động từ 7,94% (dòng H54) đến 13,87% (dòng H95), trong khi xử lý bằng chủng EHA105 giá trị này dao động từ 5,46 (dòng HIL9) đến 18,66% (dòng H14). Tỷ lệ mô sẹo chọn lọc được khác nhau ở các dòng ngô sau xử lý chuyển gen bằng các chủng *A. tumefaciens* khác nhau cũng đã được nhiều tác giả công bố [8, 9, 14, 16].

#### Tái sinh cây chuyển gen

Các mô sẹo sau khi chọn lọc trên môi trường chọn lọc A3 được chuyển sang môi trường A4 để phục hồi, sau đó chuyển sang môi trường tái sinh A5. Kết quả nhận được cho thấy,

tỷ lệ tái sinh cao từ các dòng ngô H26, H240, H14, H4, H95 và CML161 và giá trị đạt từ 36% đến 73% đối với mô chuyển gen bằng chủng *A. tumefaciens* C58 và 49,99% đến 88,00% đối với mô chuyển gen bằng chủng EHA105 (bảng

2). Các dòng N18, H64, H54, H20 và H21 cho tỷ lệ cây tái sinh thấp, chỉ từ 0,0% (N18/C58) đến 30,0% (H64/C58). Số cây tái sinh bình thường nhận được từ mỗi mô sẹo của của dòng ngô nghiên cứu từ 1 đến 4 cây.

**Bảng 1.** Kết quả chọn lọc mô sẹo chuyển gen từ các dòng ngô nghiên cứu (vụ xuân 2013)

Dòng ngô gốc	Chuyển gen bằng chủng C58			Chuyển gen bằng chủng EHA105		
	Số lượng phôi xử lý	Số lượng mô sẹo được chọn lọc	Tỷ lệ mô sẹo được chọn lọc	Số lượng phôi xử lý	Số lượng mô sẹo được chọn lọc	Tỷ lệ mô sẹo được chọn lọc
N18	179	24	13,40	166	22	13,25
H64	242	25	10,33	140	18	12,85
H54	214	17	7,94	190	18	9,47
H26	106	15	14,15	120	13	10,83
HIL9	214	18	8,41	183	10	5,46
H240	276	36	13,04	116	19	16,37
H14	155	17	10,96	150	28	18,66
H4	181	24	13,25	187	31	16,57
H95	245	34	13,87	294	46	15,64
H20	396	54	13,63	331	39	11,78
H21	178	22	12,35	185	24	12,97
CML161	117	14	11,96	179	27	15,08
Tổng	2503	300	11,98	2241	295	13,16

**Bảng 2.** Kết quả tái sinh cây chuyển gen *Sh2* từ các dòng ngô nghiên cứu

Dòng ngô gốc	Chuyển gen bằng chủng C58				Chuyển gen bằng chủng EHA105			
	Số mô sẹo cấy	Số mô tái sinh	Tỷ lệ tái sinh (%)	Số cây tái sinh bình thường	Số mô sẹo cấy	Số mô tái sinh	Tỷ lệ tái sinh (%)	Số cây tái sinh bình thường
N18	20	0	0	0	20	1	4,00	2
H64	20	6	30,00	11	18	5	27,77	12
H54	15	3	19,99	5	18	2	11,11	5
H26	15	11	73,33	22	13	8	61,53	21
HIL9	18	2	11,11	3	10	1	1,00	2
H240	25	17	68,00	38	19	12	63,15	31
H14	17	11	64,70	23	18	9	49,99	22
H4	20	9	36,00	22	30	15	49,99	29
H95	30	20	66,66	38	40	26	65,00	42
H20	40	11	27,50	12	30	7	23,33	9
H21	20	7	28,00	11	20	5	25,00	8
CML161	14	8	57,14	15	25	22	88,00	25
Tổng	254	105	40,20	195	261	113	39,15	208

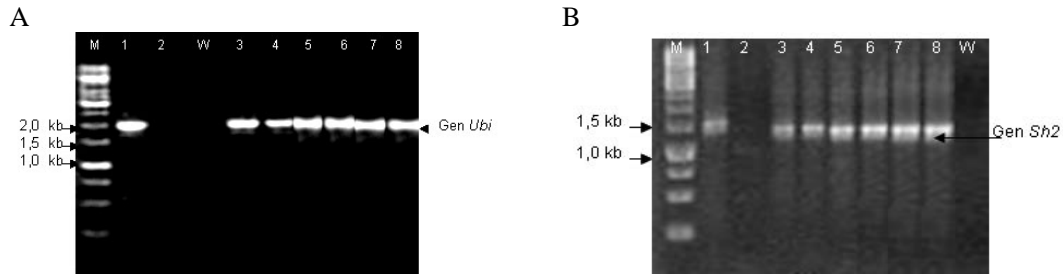
### Phân tích phân tử các cây ngô chuyển gen

Kiểm tra sự có mặt của gen *Ubi* và *Sh2* trong các cây ngô chuyển gen bằng PCR

Gen *Sh2* được thể hiện với sự điều khiển của chuỗi khởi động Ubiquitin trong cấu trúc pCambia1301/Ubi/Sh2. Sự có mặt của các gen

chuyển nạp trong cây ngô chuyển gen được kiểm tra bằng nhân bản gen *Ubi* (2.0 kb) và *Sh2* (1,5 kb) với các cặp mồi đặc hiệu như đã trình bày trong phần phương pháp. Kết quả điện di sản phẩm PCR (hình 1) cho thấy, các cây

chuyển gen từ các dòng ngô H95, H4, H14, CML161, H240 và H26 đều có các đoạn gen có kích thước 2 kb tương ứng với kích thước của gen *Ubi* (hình 1A) và 1,5 kb tương ứng với kích thước gen *Sh2* (hình 1B).



Hình 1. Kết quả kiểm tra gen *Ubi* (A) và *Sh2* (B) trong các cây ngô chuyển gen

A. Kết quả kiểm tra sự có mặt của gen *Ubi* trong các cây ngô chuyển gen bằng PCR với mồi đặc hiệu. M: DNA marker 1 kb; 1: Đối chứng dương (DNA plasmid); 2: Đối chứng âm (nước); W: cây không chuyển gen; 3-8: các cây ngô chuyển gen từ các dòng ngô H4 (3), H14(4), H240 (5), H95(6), H26(7) và CML161(8); B. Kết quả kiểm tra sự có mặt của gen *Sh2* trong các cây ngô chuyển gen bằng PCR với mồi đặc hiệu. M: DNA marker 1 kb; 1: Đối chứng dương (DNA plasmid); 2: Đối chứng âm (nước); W: cây không chuyển gen; 3-8: các cây ngô chuyển gen từ các dòng ngô H4 (3), H14(4), H240 (5), H95(6), H26(7) và CML161(8).

Bảng 3. Kết quả kiểm tra sự có mặt của gen chuyển nạp trong cây chuyển gen T0 bằng PCR.

Dòng ngô gốc	Số cây chuyển gen từ mỗi dòng gốc	Số cây dương tính với gen <i>Ubi</i>	Số cây dương tính với gen <i>Sh2</i>
H95	66	9	9
H4	42	5	5
H14	40	6	6
CML161	37	6	6
H240	54	10	10
H26	38	5	5
Tổng	277	41	41

Kết quả kiểm tra gen *Ubi* và *Sh2* trong các cây ngô chuyển gen T0 từ 6 dòng ngô có tỷ lệ tái sinh cao được trình bày trong bảng 3.

Kết quả kiểm tra 277 cây chuyển gen T0 từ 6 dòng ngô nghiên cứu đã nhận được 41 cây dương tính với gen *Ubi* và *Sh2*. Số lượng cây dương tính với hai gen ở các dòng ngô dao động từ 5 đến 10 cây, qua đây chúng tôi có thể đưa ra kết luận các cây ngô chuyển gen có mang gen đích *Sh2*.

Kết quả chuyển nạp gen cũng cho chúng tôi thấy các chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* khác nhau cho tỷ lệ chuyển nạp gen khác nhau (bảng 4). Qua bảng 4 chúng tôi nhận thấy, hiệu suất

chuyển gen của chủng vi khuẩn EHA105 cao hơn chủng vi khuẩn C58. Tỷ lệ cây chuyển gen nhận được bằng chủng vi khuẩn EHA105 ở các dòng ngô nghiên cứu đạt từ 1,60 (dòng H4) đến 4,31% (dòng H240), hiệu suất chung tính bằng tổng số cây chuyển gen thu được (25 cây từ 6 dòng) trên tổng số phôi xử lý của cả 6 dòng (1046) là 2,39%; trong khi hiệu suất chuyển bằng chủng C58 ở các dòng ngô nghiên cứu chỉ đạt từ 1,10 đến 1,88% và hiệu suất chung chỉ đạt 1,48%. Esuola et al. (2011) [6] khi nghiên cứu ảnh hưởng của các chủng *A. tumefaciens* lên hiệu quả biểu hiện gen *GUS* cũng thấy rằng, chủng EHA105 cho hiệu quả hơn chủng C58.

Bảng 4. Hiệu suất chuyển gen của 2 chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* C58 và EHA 105

Dòng ngô gốc	Chủng EHA105			Chủng C58		
	Số phôi xử lý	Số cây chuyển gen	Hiệu suất chuyển gen (%)*	Số phôi xử lý	Số cây chuyển gen	Hiệu suất chuyển gen (%)
H95	294	6	2,04	245	3	1,22
H4	187	3	1,60	181	2	1,10
H14	150	4	2,66	155	2	1,29
CML161	179	4	2,23	117	2	1,70
H240	116	5	4,31	276	5	1,81
H26	120	3	2,49	106	2	1,88
Tổng	1046	25	2,39	1080	16	1,48

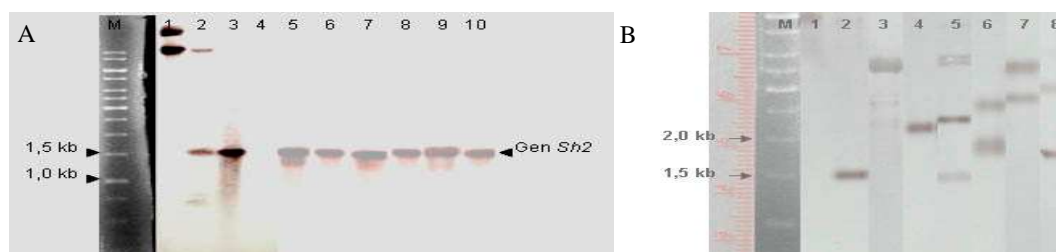
\*Hiệu suất chuyển gen ở mỗi dòng ngô nghiên cứu dựa trên tỷ lệ (%) số cây dương tính nhận được từ mỗi dòng sau khi phân tích PCR trên số phôi non được xử lý chuyển gen của dòng đó.

Phản ứng PCR thường được dùng để kiểm tra sự chuyển nạp gen đích vào cây tái sinh. Nhiều công trình đã đánh giá hiệu suất chuyển gen dựa trên kết quả phân tích cây chuyển gen T0 bằng PCR. Hiệu suất chuyển gen khác nhau nhận được khi sử dụng các chủng *A. tumefaciens* khác nhau cũng đã được một số tác giả thông báo [8, 14]. Hiệu suất chuyển gen sau khi phân tích PCR của chúng tôi cao hơn hiệu suất khi phân tích PCR của Ombori et al. (2012) [14]. Cụ thể là khi sử dụng chủng *A. tumefaciens* AGL1 cho chuyển gen *GUS* ở 9 dòng ngô, các tác giả nhận được hiệu suất chuyển gen từ 0,0% (ở 4 dòng) đến 0,4% (ở dòng A188), ở các dòng còn lại hiệu suất dao động từ 0,1 đến 0,3%; với chủng *A. tumefaciens* EHA101, hiệu suất chuyển gen đạt từ 0,0% (ở 4

dòng) đến 2,1% (ở dòng A188), ở các dòng còn lại hiệu suất dao động từ 0,2 đến 1,9%.

#### Kiểm tra gen *Sh2* trong cây ngô chuyển gen bằng lai Southern

Bốn mươi một cây chuyển gen *Sh2* dương tính sau khi kiểm tra bằng PCR được tiếp tục đánh giá bằng lai Southern. Hình 2 là kết quả lai Southern của các cây ngô chuyển gen từ 6 dòng ngô nghiên cứu. Kết quả cho thấy, các cây chuyển gen từ 6 dòng ngô H95 (5), H4 (6), H14 (7), H240 (8), H26 (9) và CML161(10) đều có gen *Sh2*. Khi DNA của các cây chuyển gen được cắt bằng hai enzyme *SacI* và *BamHI* kết quả cho thấy, các băng nhận được có kích thước 1,5 kb tương ứng với gen *Sh2* như mong đợi (hình 2A).



Hình 2. Kết quả lai Southern của các cây ngô chuyển gen *Sh2*

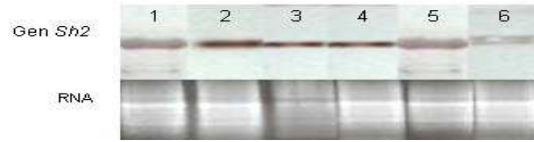
A: M. DNA marker 1 kb; 1: DNA plasmid; 2: DNA plasmid cắt bằng enzyme *SacI* và *BamHI*; 3: Mẫu đối chứng dương (gen *Sh2* nhân từ plasmid bằng môi đặc hiệu); 4: Mẫu đối chứng âm (cây chưa chuyển gen); 5-10. các cây ngô chuyển gen từ các dòng ngô H95(5), H4 (6), H14(7), H240 (8), H26(9) và CML161(10). B: M. DNA marker; 1. Đối chứng âm; 2. Đối chứng dương; 3-8 các cây ngô chuyển gen từ các dòng H95 (2), H14 (4), H240 (5), H4 (6), H26 (7) và CML161 (8).

Trong trường hợp dùng enzyme *SacI* cắt trong T-DNA kết quả nhận được các cây chuyển gen nghiên cứu có từ 1 đến 3 bản sao (hình 2B). Cụ thể là cây ở làn số 2 và số 4 từ các dòng chuyển gen của H95 và H14 có 1 bản sao; cây ở làn số 5 từ dòng chuyển gen của H240 có 3 bản sao, còn các cây ở làn số 6, 7 và 8 từ các dòng chuyển gen của H4, H26 và CML161 có 2 bản sao. Số bản sao của gen chuyển nạp đã được báo cáo dao động từ 1 đến 5 [7], hay từ 2 đến 6 [14].

*Kiểm tra sự hoạt động của gen Sh2 trong cây ngô chuyển gen bằng lai Northern*

Kết quả lai Northern 32 cây ngô T1 từ 32 dòng chuyển gen T0 dương tính với gen chuyển nạp *Sh2* sau khi kiểm tra bằng lai Southern đã

cho thấy, ở các cây ngô phân tích đều có sự hoạt động của gen chuyển đích (hình 3, bảng 5). Hình 3 là kết quả lai Northern của 6 cây ngô đại diện cho những dòng ngô chuyển gen từ các dòng ngô nghiên cứu.



Hình 3. Kết quả lai Northern của các cây ngô chuyển gen *Sh2*

1-6: đại diện các cây chuyển gen từ các dòng H95 (1), H4 (2), H14(3), H240 (4), H26 (5) và CML161 (6) (trên) và RNA tổng số từ các cây chuyển gen tương ứng (dưới).

Bảng 5. Kết quả kiểm tra gen *Sh2* trong các cây ngô chuyển gen bằng lai Southern và Northern

Dòng ngô gốc	Số cây chuyển gen <i>Sh2</i> kiểm tra dương tính bằng PCR	Số cây chuyển gen <i>Sh2</i> kiểm tra dương tính bằng lai Southern	Số cây chuyển gen <i>Sh2</i> kiểm tra dương tính bằng lai Northern	Hiệu suất chuyển gen (%)*
H95	9	8	8	1,48
H4	5	4	4	1,08
H14	6	4	4	1,31
CML161	6	4	4	1,69
H240	10	8	8	1,77
H26	5	4	4	1,77
Tổng	41	32	32	1,51

\* Hiệu suất chuyển gen *Sh2* ở mỗi dòng ngô nghiên cứu dựa trên tỷ lệ (%) số cây dương tính sau khi phân tích Southern và Northern nhận được từ mỗi dòng trên tổng số phôi non được xử lý chuyển gen của dòng đó với cả hai chủng *Agrobacterium*.



Hình 4. Hình thái cây ngô chuyển gen *Sh2* bình thường (A), cây chuyển gen không bình thường (B) và hình thái bắp ngô nhận được từ các cây chuyển gen của các dòng ngô nghiên cứu (C).



Kết quả trong bảng 5 cho thấy, hiệu suất cây có mang gen chuyển gắn vào hệ gen ở các dòng ngô dao động từ 1,08 đến 1,77%, trung bình là 1,51%. Kết quả này ít nhiều cao hơn kết quả (1,40%) của Ombori et al. (2012) [14] nhưng lại thấp hơn so với kết quả (5,5%) được công bố bởi Frame et al. (2002) [7]. Các cây ngô chuyển gen nhận được đã sinh trưởng và phát triển tốt trong nhà lưới, nhiều cây phát triển bình thường và cho bắp. Hình 4 là kiểu hình cây ngô chuyển gen bình thường và không bình thường cùng một số kiểu hình bắp thu được từ các dòng ngô chuyển gen. Việc nghiên cứu các đặc điểm sinh học và khả năng tổng hợp tinh bột của các cây ngô chuyển gen sẽ tiếp tục được nghiên cứu.

### KẾT LUẬN

Từ các kết quả nghiên cứu nhận được chúng tôi có các kết luận sau:

Đã tạo được cây ngô chuyển gen mang gen *Sh2* từ sáu dòng ngô H95, H240, H26, H14, H4 và CML161 với hiệu suất chuyển gen từ 1,08 đến 1,77%, hiệu suất trung bình là 1,51% (dựa trên kết quả phân tích Southern và Northern). Chủng *A. tumefaciens* DHA105 cho hiệu suất chuyển gen cao hơn chủng C58 và đạt từ 1,60 đến 4,31%, hiệu suất chung là 2,39% (dựa trên phân tích PCR). Các cây chuyển gen có từ 1 đến 3 bản sao gen chuyển nạp. Nhiều cây chuyển gen sinh trưởng và phát triển bình thường, cho bắp và hạt.

**Lời cảm ơn:** Công trình được thực hiện trong khuôn khổ đề tài “Nghiên cứu tạo dòng ngô bố mẹ được tăng cường khả năng tổng hợp tinh bột bằng công nghệ gen” thuộc Chương trình Trọng điểm phát triển và ứng dụng Công nghệ Sinh học trong lĩnh vực Nông nghiệp và phát triển nông thôn đến năm 2020.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bhave M. R., Lawrence S., Barton C., Hannah L. C., 1990. Identification and molecular characterization of shrunken-2 cDNA clones of maize. *Plant Cell*, 2: 581-586.
2. Chu C. C., Wang C. C., Sun C. S., Hsu C., Yin K. C., Chu C. Y., Bi F.Y., 1975. Establishment of an efficient medium for another culture of rice through comparative experiments of the nitrogen sources. *Sci. Sin.*, 18: 659-668.
3. Diallo A. O., Kifundu J., Wolde L., Odongo O., Mduruma Z. O., Chivasti W. S., Friesen D.K., Mugo S., Ba'nziger M., 2001. Drought and low nitrogen tolerant hybrids for the moist mid-altitude ecology of Eastern Africa. Seventh Eastern and Southern Africa regional Maize Conference, 11th–15th Feb 2001, pp 206-212.
4. Duvick D. N., 2001. Biotechnology in the 1930s. The development of hybrid maize. *Nature Review Genet.*, 2: 69-74.
5. Edgerton M. D., 2009. Increasing crop productivity to meet Global needs for feed, food and fuel *Plant Physiol.*, 149: 7-13.
6. Esuola C. O., Tripathi L., Fawole I., 2011. Effects of various virulent strains of *Agrobacterium tumefaciens* on genetic transformation of Banana (*Musa* sp.) cultivars Williams. *Afr. J. Hort. Sci.*, 5: 84-91.
7. Frame B. R., Shou H., Chikwamba R., Zhang Z., Xiang C., Fonger T., Pegg S-E., Li B., Nettleton D., Pei P., Wang K., 2002. *Agrobacterium*-mediated transformation of maize embryos using a standard binary vector system. *Plant Physiol.*, 129: 13-22.
8. Frame B. R., McMurray J. M., Fonger T. N., Main M. L., Taylor K. W., Torney F. J., Paz M. M., Wang K., 2006. Improved *Agrobacterium*-mediated transformation of three maize inbred lines using MS salts. *Plant Cell Rep.*, 25(10): 1024-1034.
9. Kumar V., Campbell L. M., Rathore K. S., 2011. Rapid recovery-and characterization of transformants following *Agrobacterium* mediated T-DNA transfer to sorghum. *Plant Cell Tiss. Org.*, 104: 137-146.
10. Li N., Zhang S., Zhao Y., Li B., Zhang J., 2011. Over-expression of AGPase genes enhances seed weight and starch content in transgenic maize. *Planta*, 233: 241-250.
11. Lohot V. D., Sharma-Natu P., Pandey R.,

- Ghildiyal M. C., 2010. ADP-glucose pyrophosphorylase activity in relation to starch accumulation and grain growth in wheat cultivars. *Curr. Sci.*, 98(3): 427-430.
12. Manicacci D., Falque M., Le Guillou S., Piégu B., Henry A. M., Le Guilloux M., Damerval C., De Vienne D., 2007. Maize *Sh2* gene is constrained by natural selection but escaped domestication. *J. Evol. Biol.*, 20(2): 503-16.
  13. Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum*, 15(3): 473-497.
  14. Ombori O., Muoma J. V. O., Machuka J., 2012. Agrobacterium-mediated genetic transformation of selected tropical inbred and hybrid maize (*Zea mays* L.) lines. *Plant Cell Tiss. Org.* DOI 10.1007/s11240-012-0247-1.
  15. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T., 1989. Molecular cloning a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
  16. Sharma M., Kothari-Chajer A., Jagga-Chugh S., Kothari S. L., 2011. Factors influencing Agrobacterium tumefaciens-mediated genetic transformation of Eleusine coracana (L.) Gaertn. *Plant Cell Tiss. Org.*, 105: 93-104.
  17. Shaw J. R., Hannah L. C., 1992. Genomic nucleotide sequence of a wild-type *Shrunken-2* allele of *Zea mays*. *Plant Physiol.*, 98(3): 1214-1216.
  18. Smidansky E. D., Maureen Clancy M., Meyer F. D., Lanning S. P., Blake N. K., Talbert L. E., and Giroux M.J., 2002. Enhanced ADP-glucose pyrophosphorylase activity in wheat endosperm increases seed yield. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 99(3): 1724-1729.
  19. Smidansky E. D., Martin J. M., Hannah L. C., Fischer A. M., Giroux M. J., 2003. Seed yield and plant biomass increases in rice are conferred by deregulation of endosperm ADP-glucose pyrophosphorylase. *Planta*, 216: 656-664.
  20. Nguyễn Đức Thành, Lê Hoàng Đức, 2013. Nhân dòng gen và vùng promoter Ubiquitin từ cây ngô (*Zea mays* L.). *Tạp chí Sinh học*, 35(3Se): 114-121.
  21. Nguyễn Thị Thu, Lê Hoàng Đức, Nguyễn Đức Thành, 2013. Tách dòng gen *Shrunken 2 (Sh2)* từ dòng ngô H14 và thiết kế vector chuyển gen *pCambia1301-Ubi-Sh2*. *Tạp chí Sinh học*, 35(3Se): 122-128.
  22. [http://www.nue.okstate.edu/Crop\\_Information/World\\_Wheat\\_Production.html](http://www.nue.okstate.edu/Crop_Information/World_Wheat_Production.html).

**TRANSFERRING *SHRUNKEN 2 (Sh2)* GENE CODING FOR ADP-GLUCOSE PYROPHOSPHORYLASE ENZYME INTO SOME INBRED MAIZE LINES BY *Agrobacterium tumefaciens* MEDIATED GENE TRANSFER**

**Tran Thi Luong, Nguyen Thi Thu, Nguyen Thuy Ninh, Nguyen Duc Thanh**

Institute of Biotechnology, VAST

**SUMMARY**

The *Shrunken 2 (Sh2)* gene was proved to be involved in starch biosynthesis as it codes for two large subunits of ADP-glucose pyrophosphorylase - an enzyme that plays an important role in regulating starch biosynthesis in cereal crops. The aim of this study was to transfer *Sh2* gene into some inbred maize lines and regenerate transgenic maize plants possessing transgene for further study of the role of *Sh2* gene in the enhancement of starch biosynthesis in maize. The *Agrobacterium tumefaciens* strains C58 and DHA105

harboring transformation vector pCambia1301/Ubi/Sh2 containing *Sh2* gene and monocot-specific Ubiquitin promoter were used to transfer *Sh2* gene into immature embryos of the maize lines. PCR amplification of *Ubi* and *Sh2* genes was performed to confirm the presence of the transgene in T0 transgenic plants. While, Southern and Northern hybridizations were carried out to confirm stable integration and expression of *Sh2* gene in T0 and T1 transgenic plants, respectively. Transgenic plants were regenerated from transformed calli of six maize lines H95, H240, H26, H14, H4 and CML161 with the transformation frequencies from 1.08 to 1.77%. *A. tumefaciens* strain DHA105 gave higher transformation frequencies than that of C58 strain and the values ranged from 1.60 to 4.31%. The transgenic maize plants possessed 1 to 3 copies of transgene. Many transgenic plants grew normally and set seeds. The study of the effect of transgene in starch biosynthesis in transgenic maize lines will be performed.

*Keywords:* *Agrobacterium tumefaciens*, maize lines, *Shrunken 2* (*Sh2*) gene, transformation frequency, transgenic plant.

*Ngày nhận bài:* 23-1-2014