

## BƯỚC ĐẦU TẠO CÂY THUỐC LÁ (*NICOTIANA TABACUM* L.) CHUYỂN GIEN NHỜ VI KHUẨN *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

TRẦN THỊ DUNG

Trường đại học Nông-Lâm, Tp. Hồ Chí Minh

NGUYỄN HỮU HỒ

Viện Sinh học nhiệt đới

Trong mục đích tạo ra các giống thuốc lá có tính kháng sâu, giảm sử dụng nông dược, nâng cao năng suất cây trồng, gen độc tố *Bt* của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* đã được chuyển vào cây thuốc lá nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. Sự có mặt của gen *Bt* ở cây chuyển gen buộc cây trồng sinh ra các protein độc tố để tự bảo vệ mình chống lại sâu gây hại thuộc họ Cánh vảy. Gen chỉ thị *gus A* và gen chọn lọc *bar* được gắn vào plasmid pIBT 2 nhằm để chọn lọc và đánh giá kết quả chuyển gen.

Phương pháp PCR được dùng để kiểm tra sự hiện diện của gen *Bt* ở mức phân tử.

### I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 1. Vật liệu

Nguyên liệu chuyển gen: mẫu lá của cây thuốc lá sợi vàng K326 in vitro được nuôi cấy từ 1 tháng tuổi trở lên.

Vi khuẩn và plasmid mang gen chuyển nạp: chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*

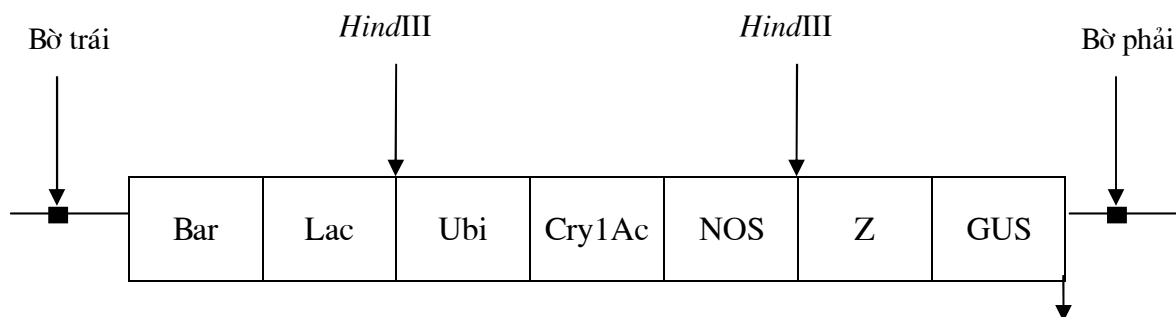
EHA 105 mang plasmid pIBT2 kích thước 15,3 kb do Viện Sinh học nhiệt đới cấu trúc.

Gen chuyển nạp:

- Gen *gus A*: gen mã hóa cho enzym  $\beta$ -glucuronidaza được phân lập từ vi khuẩn *E.coli*.  $\beta$ -glucuronidaza là một hydrolaza có tác dụng xúc tác sự phân giải các  $\beta$ -glucorunit (cơ chất X-gluc) tạo ra sản phẩm màu xanh chàm đặc trưng để nhận biết.

- Gen *bar*: gen mã hóa cho enzym phosphinothricin axetyltransferaza có nguồn gốc từ vi khuẩn *Streptomyces hygroscopicus*. Enzym này có tác dụng làm mất độc tính của phosphinothricin (PPT), hoạt chất chính của thuốc diệt cỏ, bằng cách biến đổi PPT từ dạng có tính diệt cỏ sang dạng bị axetyl hóa không có tính diệt cỏ.

- Gen *cryIA(c)* (gen *Bt*): mã hóa cho protein độc tố (thuộc loại  $\delta$ -endotoxin) của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis* gây độc cho sâu thuộc bộ Cánh vảy (Lepidoptera).



Cấu trúc plasmid pITHB2

Môi trường nuôi cấy: thành phần cơ bản theo MS (Murashige & Skoog) với chất kích thích sinh trưởng BA, NAA để tạo chồi thuốc lá;

chất kháng sinh xefotaxim để diệt vi khuẩn tránh sự tái nhiễm *Agrobacterium* sau khi chuyển gen; hoạt chất của thuốc diệt cỏ PPT

(phosphinothricin) để xác định sự hiện diện của gen *bar*.

Hóa chất: Dung dịch nhuộm X-gluc, hóa chất chiết xuất ADN thực vật, thực hiện phản ứng PCR và chạy điện di.

## 2. Phương pháp

Chuyển gen vào thuốc lá: lá cây thuốc lá in vitro được cắt thành từng mảnh có kích thước 1 × 1 cm, loại bỏ gân giữa và mép lá. Nuôi chung mẫu lá và vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* mang plasmid pIBT2 (OD = 0,6). Sau 2 ngày, vi khuẩn xâm nhiễm vào các mẫu lá, thực hiện quá trình chuyển nạp gen vào tế bào.

Chọn lọc các mẫu lá có chứa gen *bar*:

- Giai đoạn chồi: đặt các mẫu lá có và không xử lý vi khuẩn trên môi trường có nồng độ PPT tăng dần từ 5-10 mg/l, theo dõi số mẫu lá tái sinh chồi sau 3 đến 5 tuần nuôi cấy.

- Giai đoạn cây: đặt các chồi thuốc lá (cao 2 cm) có và không xử lý vi khuẩn trên môi trường cấy (không có chất kích thích sinh trưởng), có nồng độ PPT tăng từ 10-30 mg/l, theo dõi tỷ lệ cây sống sau 4 tuần nuôi cấy.

Xác định sự có mặt của gen *gus A*: Ngâm các mẫu lá có xử lý vi khuẩn (phát triển xanh tốt trên môi trường chọn lọc) và không xử lý vi khuẩn (tái sinh tốt trên môi trường không có PPT và xefotaxim) trong dung dịch X-gluc (để qua đêm ở 37°C), theo dõi số mẫu lá biểu hiện màu xanh chàm,

Xác định sự hiện diện của gen *Bt*: Dịch chiết ADN được cho vào hỗn hợp PCR. Thực hiện phản ứng PCR để khuếch đại gen *Bt*:

Chu kỳ đầu: 95°C/7'; 54°C/1'; 72°C/1'  
Các chu kỳ sau: 95°C/1'; 54°C/1'; 72°C/1'  
Chu kỳ cuối: 95°C/7'; 54°C/1'; 72°C/1' } 30 chu kỳ

Điện di sản phẩm PCR trên bản gel agarosa 1% và quan sát kết quả để xác định vị trí của gen *Bt* theo thang ADN chuẩn.

## II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 1. Chuyển gen vào tế bào thuốc lá

Nuôi chung mẫu lá và chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* EHA 105/pITB2.

Mẫu lá dùng trong chuyển gen được lấy ra

khỏi môi trường tạo chồi, cắt thành miếng và đặt vào 10 ml dung dịch vi khuẩn trong đĩa petri. Ngâm lá trong 20 phút. Sau đó, các mẫu lá được đặt trên môi trường chồi nuôi chung với vi khuẩn trong thời gian là 48 giờ để các mẫu lá không bị hủy hoại. Đặt mẫu trong tối.

Sau 2 ngày, vi khuẩn mọc thành lớp mỏng trắng đục trên bề mặt môi trường. Các mẫu lá đã nhiễm khuẩn này được rửa sạch nhiều lần bằng nước cất vô trùng có pha 500 mg/l xefotaxim. Xefotaxim là chất kháng sinh dùng để diệt vi khuẩn *A. tumefaciens* với mục đích tránh sự tái nhiễm sau khi mô thuốc lá đã được chuyển gen.

Các mẫu lá đã xử lý vi khuẩn được đặt trên môi trường có nồng độ PPT (phosphinothricin) tăng từ 5-10 mg/l môi trường để chọn lọc các mẫu lá có chứa gen *bar* kháng thuốc diệt cỏ.

Sau 3 tuần nuôi cấy, các mẫu lá được xử lý vi khuẩn xuất hiện các cụm chồi nhỏ. Tiếp tục cấy chuyển mỗi tuần một lần đến khi chồi phát triển thành thân, lá. Tách cây chuyển sang môi trường có PPT nồng độ tăng từ 10-30 mg/l môi trường để xác định sự có mặt của gen *bar* và không có chất kích thích sinh trưởng để cây ra rễ.

PPT là hoạt chất chính của thuốc diệt cỏ và là chất dùng để sàng lọc các tế bào mô đã được chuyển gen kháng thuốc diệt cỏ. Tế bào được chuyển gen *bar* sẽ mã hóa cho enzym phosphinothricin axetyltransferaza có tác dụng kháng được thuốc diệt cỏ.

Các mẫu lá không xử lý vi khuẩn khi đặt trên môi trường có thuốc diệt cỏ sẽ vàng và chết dần. Còn các mẫu lá được xử lý vi khuẩn khi đặt trên môi trường có thuốc diệt cỏ, sau 3 tuần sẽ tái sinh chồi, chứng tỏ có sự hiện diện của gen *bar*.

### 2. Chọn lọc các mẫu lá có chứa gen *bar*

#### a) Giai đoạn chồi

Sau 3 tuần nuôi cấy, các mẫu lá bắt đầu xuất hiện chồi. Trên môi trường có nồng độ PPT 5 mg/l, các mẫu lá có xử lý vi khuẩn cho tỷ lệ tái sinh chồi là 60% và các mẫu lá đối chứng vẫn có sự tái sinh chồi với tỷ lệ là 10%. Điều này cho thấy chưa thể kết luận các mẫu lá đã xử lý vi khuẩn là các mẫu đã chuyển gen, có thể do nồng độ PPT còn quá thấp.

Sau 5 tuần nuôi cấy, các mẫu lá xuất hiện nhiều chồi. Trên môi trường có nồng độ PPT tăng lên 10 mg/l, các chồi đã tái sinh trên mẫu lá có xử lý vi khuẩn phát triển xanh tốt, trong

khi ở đối chứng chết vàng. Điều này chứng tỏ các mẫu lá đã xử lý vi khuẩn có mang gen *bar* kháng thuốc diệt cỏ ở nồng độ PPT 10 mg/l (bảng 1).

Bảng 1

Tỷ lệ mẫu lá tái sinh trên môi trường chọn lọc kháng thuốc diệt cỏ (%)

Thời gian nuôi cấy	Nồng độ PPT (mg/l)	Mẫu lá chuyển gen			Mẫu lá đối chứng		
		Số mẫu lá Ban đầu	Số mẫu lá tái sinh	Tỷ lệ mẫu lá tái sinh (%)	Số mẫu lá ban đầu	Số mẫu lá tái sinh	Tỷ lệ mẫu lá tái sinh (%)
3 tuần	5	20	12	60	20	2	10
5 tuần	10	12	12	100	2	0	0

b) Giai đoạn cây

Sau 4 tuần nuôi cấy, các cây thuốc lá được chuyển gen (có xử lý vi khuẩn) xuất hiện 3 lá và có nhiều rễ trong môi trường có PPT nồng độ 10-30 mg/l, tỷ lệ cây sống đạt 100% trong khi các cây đối chứng chết vàng (bảng 2).

Như vậy, trong quá trình nuôi chung mẫu lá với vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*, việc chuyển gen đã được thực hiện thông qua plasmid pITB2, vì thế các mẫu lá và cây thuốc lá vẫn sống được trên môi trường có thuốc diệt cỏ với nồng độ PPT tăng từ 10-30 mg/l.

Bảng 2

Tỷ lệ cây thuốc lá sống được trên môi trường chọn lọc kháng thuốc diệt cỏ sau 4 tuần nuôi cấy (%)

Nồng độ PPT (mg/l)	Cây thuốc lá chuyển gen			Cây thuốc lá đối chứng		
	Số cây ban đầu	Số cây sống	Tỷ lệ cây sống (%)	Số cây ban đầu	Số cây sống	Tỷ lệ cây sống (%)
10	20	20	100	20	0	0
20	20	20	100	20	0	0
30	20	20	100	20	0	0



Hình 1. Mẫu lá thuốc lá có xử lý vi khuẩn tái sinh chồi và đối chứng chết vàng trên môi trường có PPT (10 mg/l)



Hình 2. Cây thuốc lá mang gen *bar* sống trong môi trường có PPT (30 mg/l)



Hình 3. Cây thuốc lá đối chứng chết vàng trong môi trường có PPT(30 mg/l)

### 3. Xác định sự có mặt của gen *gus A*

Để tiếp tục khẳng định các mẫu lá đã được chuyển gen, thí nghiệm chứng minh sự có mặt của gen *gus A* khi đem nhuộm các mẫu lá với cơ chất X-gluc.

Các mẫu lá đã được chọn lọc và các mẫu lá đối chứng, sau khi đem ngâm trong dung dịch X-gluc, được rửa nhiều lần bằng cồn 70°, mỗi lần cách nhau vài giờ. Cồn có tác dụng hòa tan diệp lục, riêng màu xanh chàm đặc trưng của gen *gus A* rất bền với cồn. Do đó, sau nhiều lần

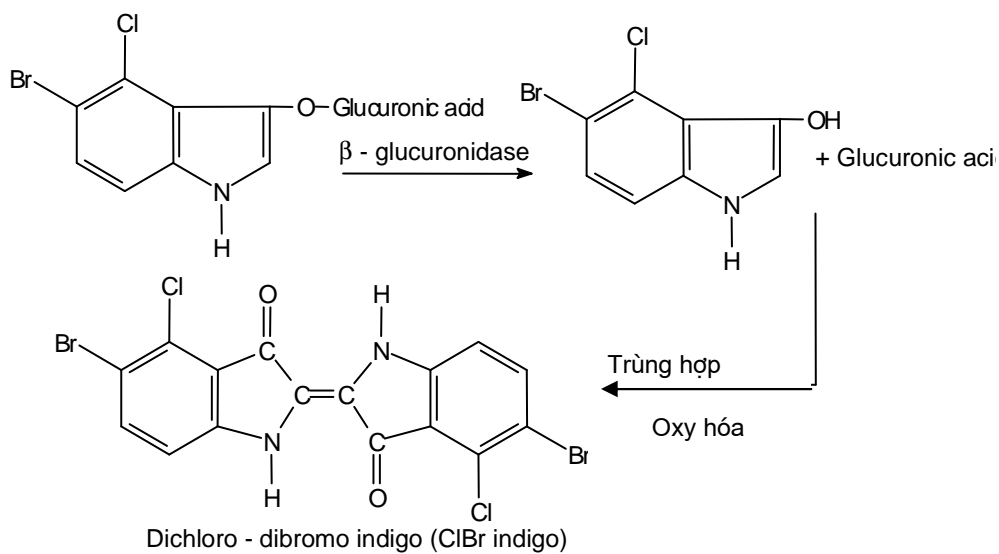
rửa, mẫu lá không có gen *gus A* sẽ trở nên trong dần hoặc có màu vàng nhạt, mẫu lá biểu hiện gen *gus A* có màu xanh chàm (bảng 3).

Như vậy, sau khi chọn lọc trên môi trường kháng thuốc diệt cỏ, các mẫu lá còn biểu hiện sự có mặt của gen *gus A*. Trong tự nhiên, enzyme  $\beta$ -glucuronidaza do gen *gus A* mã hóa không tồn tại trong thực vật, vì vậy gen *gus A* là một gen chỉ thị rất tốt trong công nghệ gen thực vật. Mật khác sản phẩm màu xanh của gen *gus A* rất bền và phản ứng rất ít bị ảnh hưởng của pH nên rất thuận tiện cho việc theo dõi.

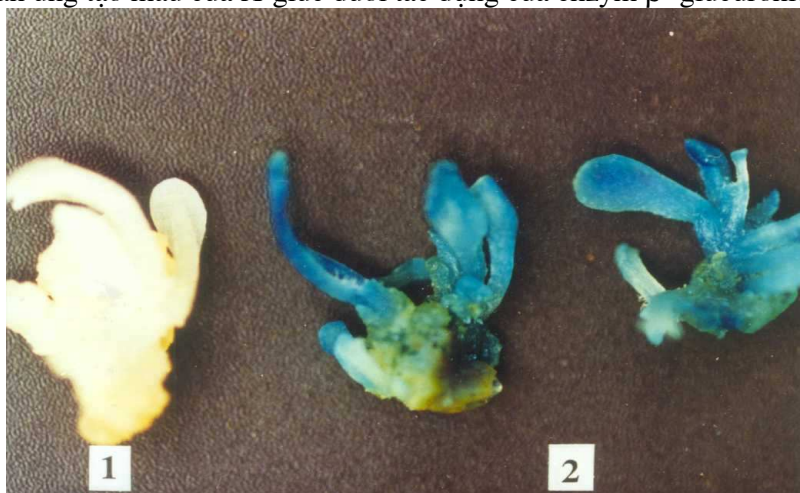
Bảng 3

Tỷ lệ mẫu lá biểu hiện màu xanh chàm (%)

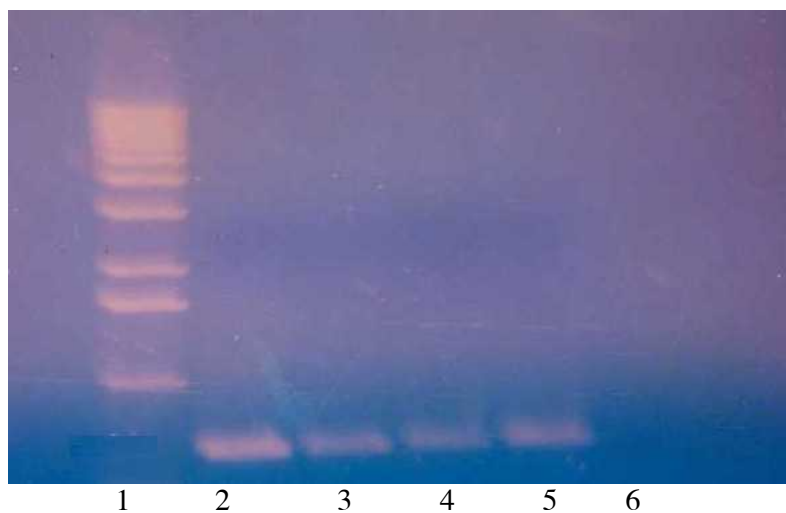
Chỉ tiêu	Mẫu lá chuyển gen	Mẫu lá đối chứng
Số mẫu lá ban đầu	10	10
Số mẫu lá biểu hiện màu xanh chàm	10	0
Tỷ lệ mẫu lá biểu hiện màu xanh chàm (%)	100	0



Phản ứng tạo màu của X-gluc dưới tác dụng của enzym  $\beta$ -glucuronidaza



Hình 4. Thuốc lá chuyển gien màu xanh chàm (2) và đối chứng không màu khi nhuộm X-gluc (1)



1. Thang ADN chuẩn 1 kb
2. ADN của plasmid pITB2
- 3,4,5. ADN của cây thuốc lá chuyển gien
6. ADN của cây đối chứng

Hình 5. Kết quả điện di sản phẩm PCR

#### 4. Xác định sự có mặt của gen *Bt*

PCR với cặp môi đặc trưng có khả năng khuếch đại hàng triệu lần một đoạn ADN (gen) tương ứng. Kỹ thuật điện di sẽ cho phép quan sát băng mắt thường gen lạ này. Kết quả điện di trên hình 5 cho thấy băng ADN của gen *Bt* nằm ở vạch 0,6 kb trên mẫu của cây thuốc lá chuyển gen và của plasmid pITB2, trong khi mẫu đối chứng không xuất hiện băng này.

### III. KẾT LUẬN

1. Kết quả ban đầu đã xác định được sự hiện diện của gen *bar* (gen chọn lọc kháng thuốc diệt cỏ) và gen *gus A* (gen chỉ thị màu khi gặp X-gluc) trong các mẫu lá và cây thuốc lá chuyển gen. Điều này cho thấy, sau khi chuyển gen, enzym phosphinothricin acetyltransferaza (kháng thuốc diệt cỏ) và enzym  $\beta$ -glucuronidaza (phân giải  $\beta$ -glucuronit tạo màu xanh chàm) đã hoạt động. Có thể suy ra là ADN của plasmid đã được gắn vào bộ gen của thực vật nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* và đã biểu hiện gen qua việc sinh tổng hợp nên các enzym nói trên.

2. Gen *Bt*, có độ lớn theo tài liệu khoảng 0,6 kb, mã hóa cho protein độc tố của vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*. Khi sử dụng kỹ thuật

PCR khuếch đại số lượng ADN cần nhận biết với cặp môi đặc trưng cho gen *Bt*, đã thấy xuất hiện ở cây thuốc lá có xử lý chuyển gen băng ADN có kích thước cỡ 0,6 kb so với thang chuẩn, trong khi băng ADN này vắng mặt hoàn toàn ở mẫu đối chứng không xử lý chuyển gen.

Trên cơ sở đó, bước đầu có thể nhận định gen *Bt* cấu trúc trong plasmid pITB2 đã được chuyển vào cây thuốc lá nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. **Hooykaas P. J. J. and Schilperoort R. A.**, 1992: Plant Mol. Biol., 19: 15-18.
2. **Klee H., R. Horsch and S. Rogers**, 1987: Annu.Rev. plant Physiol., 38: 467-486.
3. **Miki B. L. et al.**, 1993: Procedure for introducing foreign DNA into plants. CRC press, Boca Raton.
4. **Nguyễn Văn Uyển**, 1996: Những phương pháp công nghệ sinh học thực vật, 1: 31-53, 68-93. NXB Nông Nghiệp.
5. **Walkerpeach C. R. and Velten J.**, 1994: *Agrobacterium* mediated gene transfer to plant cells. Plant Mol. Biol., 1-19.

## GENE TRANSFER INTO TOBACCO PLANT (*NICOTIANA TABACUM* L.) MEDIATED BY *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

TRAN THI DUNG, NGUYEN HUU HO

### SUMMARY

The transfer of foreign genes into high plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* is a standard technique in plant molecular biology and genetic engineering.

Leaf discs of the tobacco cultivar K326 were co-cultivated with *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA 105 harbouring the plasmid pITB2 containing *cryIA(c)*, *bar* and *gus A* genes. Infected leaves were transferred onto the MS (Murashige & Skoog) medium supplemented with 5-30 mg/l PPT (phosphinothricin) for selection of the transformants. PPT resistant shoots have been obtained and they also expressed the *gus* activity. The presence of the *Bt* toxin gene from *Bacillus thuringiensis* was shown by PCR (polymerase chain reaction).

Ngày nhận bài: 10-4-2002