

## NGHIÊN CỨU CHUYỂN GEN NGUYÊN CÂY Ở NGÔ

Đinh Văn Trinh, Phạm Thị Lý Thu, Lê Thị Thu Vê, Nguyễn Văn Toàn, Nguyễn Văn Đông

Viện Di Truyền nông nghiệp

### TÓM TẮT

Hầu hết các phương pháp chuyển gen vào ngô (*Zea mays* L.) hiện nay thường đòi hỏi các thao tác nuôi cấy mô với thời gian và chi phí tốn kém. Hơn nữa, chúng chỉ áp dụng được với một số kiểu gen có khả năng tái sinh cao. Lần đầu tiên tại Việt Nam, chúng tôi áp dụng phương pháp chuyển gen nguyên cây. Đây là phương pháp đơn giản, kinh tế có thể áp dụng cho nhiều giống ngô thông qua hệ thống sinh sản cái. Thí nghiệm chuyển gen thực hiện với chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 chứa vector pBiG.ubi mang gen chịu hạn - *ZmDREB2A* và gen kháng hygromycin - *hpt*. Râu ngô (hoa cái) được cách ly và tiếp xúc với dịch huyền phù vi khuẩn trước khi thụ phấn với hạt phấn của cùng dòng. 135 bắp (13145 hạt  $T_0$ ) đã thu được trong vụ đông xuân năm 2006 - 2007. Cây con chuyển gen giai đoạn 2 - 3 lá được sàng lọc bằng điều kiện khô hạn. Phép thử tính kháng hygromycin và phân tích PCR trên 59 cây  $T_0$  sống sót sau xử lý hạn cho thấy hiệu quả chuyển gen ở thế hệ  $T_0$  đạt 0,023%.

**Từ khóa:** *Agrobacterium tumefaciens*, chịu hạn, chuyển gen nguyên cây, ngô, *ZmDREB2A*

### ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngô với tầm quan trọng của nó đã trở thành đối tượng chuyển gen từ khá lâu. Vấn đề khó khăn nhất trong chuyển gen ngô là khả năng tái sinh kém, chỉ một số dòng mô hình là A188 hay H99 (Hodges *et al.*, 1986) hay các con lai của chúng được dùng trong chuyển gen. Bộ phận chủ yếu được dùng để biến nạp là phôi non (Isida *et al.*, 2007) luôn bị hạn chế bởi mùa vụ. Để khắc phục, các tác giả đã tìm cách tạo mô sẹo từ những nguồn khác nhau như lá, hạt già và cây con (Sidorov *et al.*, 2006; Ahmadabadi *et al.*, 2007) hay chuyển gen trực tiếp vào chồi đỉnh. Tuy nhiên, tất cả các phương pháp này đều đòi hỏi những thao tác nuôi cấy mô với thời gian và chi phí cao. Hơn nữa, các cây ngô thu được sau nuôi cấy mô thường bị dị dạng và có thời gian phun râu, tung phần lệch nhau.

Phương pháp chuyển gen nguyên cây lần đầu tiên áp dụng thành công ở *Arabidopsis thaliana* (Bechtold *et al.*, 1993). Với ưu điểm vượt trội là đơn giản, rẻ tiền, không đòi hỏi thao tác nuôi cấy mô, chuyển gen nguyên cây đã liên tục được nghiên cứu và áp dụng thành công ở nhiều đối tượng khác nhau (Weeks *et al.*, 2008).

Trong nghiên cứu hiện tại, chúng tôi khảo sát khả năng tiếp nhận gen thông qua phương pháp chuyển gen nguyên cây với gen chịu hạn *ZmDREB2A* trên đối tượng là các dòng ngô Việt

Nam. Các nghiên cứu tiếp theo nhằm mục đích tối ưu hóa quy trình đưa ra áp dụng, tránh các thao tác nuôi cấy mô tốn kém và phức tạp.

### VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

#### Vật liệu thực vật

Bảy dòng ngô thuần và ngô lai chiến lược (TV2, TV3, TV5, TV9, TV10, TV 21, TV31) của Viện Di truyền nông nghiệp được dùng để thí nghiệm. Hơn 135 cây ngô thời kì ra râu được bao bắp để cách li, chiều dài râu từ 2 - 3 cm là thích hợp cho việc biến nạp gen.

#### Chuẩn bị vi khuẩn và biến nạp gen

Chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 mang vector pBiG.ubi (promoter Ubiquitin, gen chịu hạn - *ZmDREB2A* và *hpt* - kháng hygromycin) do Phòng Tài nguyên sinh vật, Trung tâm nghiên cứu quốc tế về Khoa học Nông nghiệp Nhật Bản (JIRCAS) cung cấp. Cấu trúc vector như hình 1.

Vi khuẩn được nuôi trên môi trường LB ở 28°C trong 12 - 14 h, tốc độ lắc 180 vòng/phút để đạt mật độ từ 1 đến 1.2 khi đo OD ở bước sóng 600 nm. Gen *vir* được hoạt hóa bằng acetosyringone với nồng độ cuối cùng là 100  $\mu$ M khoảng 2 h trước khi biến nạp.

Dịch vi khuẩn được cho tiếp xúc với râu ngô đã cùng dòng ngô và bao cách li trở lại (Chumakow *et al.*, 2006).



Hình 1. Cấu trúc vector.

### Sàng lọc và phân tích cây chuyển gen

Cây con  $T_0$  mang gen *ZmDREB2A* và cây đối chứng âm (đã được đánh dấu) được trồng trong các khay nhựa kích thước 7 hàng  $\times$  10 hàng chứa giá thể nguồn gốc từ Viện Nông hóa Thổ nhưỡng. Cây ngô đến giai đoạn 2 - 3 lá sẽ được tưới nước đều và để hạn trong vòng 12 - 14 ngày (tùy thuộc vào dòng). Khi toàn bộ cây đối chứng âm đã chết, các cây sẽ được tưới nước trở lại để sàng lọc cây chịu hạn. Lá của các cây sống sót được thu để tách DNA tổng số theo quy trình cải biến của Lin và đồng tác giả (2001).

Phân tích PCR tiến hành với cặp mồi F-5' CCCTGCCTTCATACGCTATT -3', R-5' AAAAGCAAGCACTCTTTTAA -3' đặc hiệu cho gen *ZmDREB2A*; thành phần PCR được bổ sung betaine và DMSO để tăng độ nhạy. Chương trình phản ứng (95°C - 5 phút, 98°C - 15 giây, 56°C - 15 giây, 72°C - 1 phút 30 giây, lặp lại trong 30 chu kỳ, 72°C - 7 phút, kết thúc -4°C). Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel agarose 1%.

Lá của cây chuyển gen sống sót sau sàng lọc bằng điều kiện khô hạn sẽ được khử trùng, cắt với kích thước 1 cm  $\times$  1 cm và đặt trong môi trường MS có chứa 50 mg/l hygromycin để kiểm tra tính kháng kháng sinh (Wang, Waterhouse, 1997).

### KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### Thu hoạch, đánh giá bắp ngô sau chuyển gen

Trong vụ đông xuân 2006 - 2007, biến nạp gen với vector pBig.ubi trên 7 dòng ngô thu được 135 bắp, 13145 hạt. Trong đó: dòng TV2 (2310 hạt), dòng TV3 (1925 hạt), TV5 (1650 hạt), TV9 (1650 hạt), TV10 (550 hạt), TV21 (2750 hạt), TV 31(2310 hạt). Số lượng hạt trên mỗi bắp dao động rất lớn từ 5

- 270 hạt, trung bình 97 hạt/bắp, thấp hơn nhiều so với cây bình thường không được chuyển gen (khoảng 250 hạt/bắp). Như vậy, việc biến nạp gen có ảnh hưởng tới khả năng thụ phấn. Nghiên cứu của (Chumakov *et al.*, 2006) cũng cho kết quả tương tự (trung bình đạt 48 hạt/bắp) và giải thích nguyên nhân là do hạt phần bị ngâm trong dịch vi khuẩn, nhưng tác giả không giải thích tại sao số lượng hạt trên bắp lại có sự dao động lớn đến như vậy. Các yếu tố khác như thời gian thích hợp cho thụ phấn khi biến nạp (độ dài râu khác nhau), thời gian thụ phấn sau biến nạp cùng với độ chín của hạt phần là những yếu tố luôn biến động có thể ảnh hưởng tới hiệu quả của quá trình nảy mầm và thụ tinh của hạt phần.

#### Sàng lọc cây chuyển gen bằng điều kiện khô hạn

Gen *ZmDREB2A* thuộc họ gen *DREB*, là các gen mã hóa cho các nhân tố phiên mã tham gia vào tính chống chịu tác nhân stress mặn, hạn hán và lạnh. Sự biểu hiện của gen *DREB* sẽ hoạt hóa một loạt các gen đích có vai trò trực tiếp tham gia vào tính chống chịu như đóng mở khí khổng, sự hút nước, sản xuất các chất điều hòa... (Sakuma *et al.*, 2006). *ZmDREB2A* là gen quyết định tính chống chịu ở ngô, bao gồm hai dạng *ZmDREB2A-L* và *ZmDREB2A-S* cùng có chung một đoạn trình tự nucleotide dài 1283 bp, mã hóa cho 318 amino acid (Qin *et al.*, 2007).

Cây đã được chuyển gen *ZmDREB2A* sẽ chống chịu tốt hơn trong điều kiện khô hạn, thể hiện ở hai đặc tính là có thể sống trong điều kiện hạn hán và phục hồi tốt hơn sau khi tưới trở lại. Sau khi sàng lọc, từ 13145 hạt thu được 59 cây sống sót, đạt tỷ lệ 0,449% (Bảng 1).

Đây là lần đầu tiên, điều kiện hạn hán được dùng để sàng lọc cây chuyển gen. Tuy nhiên, quy trình sàng lọc chưa được nghiên cứu tối ưu với từng dòng ngô có thể dẫn tới hiệu quả sàng lọc kém và ảnh

hường tới khả năng sinh trưởng của cây. Vấn đề đặt ra trong thời gian tới là nghiên cứu giới hạn trên và giới hạn dưới cho từng dòng ngô để quá trình sàng lọc đạt hiệu quả cao hơn. Trong số những cây sống sót sau sàng lọc, một số lượng lớn cây mang hình dạng và quá trình sinh trưởng, phát triển không bình thường (Hình 2). Nguyên nhân có thể là hoạt động quá mạnh của promoter Ubiquitin hoặc quá trình hạn hán lâu ngày đã làm thay đổi chu kì phát triển của cây ngô. Theo nghiên cứu của một số tác giả, hoạt động mạnh của promoter này đã làm dị dạng lá, hoa, rễ và gây rối loạn chu kì phát triển ở cây lúa chuyển

gen (Ge *et al.*, 2004). Tuy nhiên, hầu hết các nghiên cứu cây chuyển gen khác có dùng promoter Ubiquitin vẫn cho cây chuyển gen với kiểu hình bình thường, do vậy đây là một vấn đề cần phải tiếp tục nghiên cứu thêm.

Dưới điều kiện hạn hán lâu dài, không những cây dị dạng mà những cây có hình dạng bình thường cũng có hiện tượng sinh trưởng kém, thời gian trở cờ và phun râu không đồng nhất gây khó khăn cho việc thu bắp. Sức khỏe cây yếu cộng với khả năng thụ phấn không tốt đã dẫn tới chất lượng bắp kém và số lượng hạt ít (Hình 3).

**Bảng 1.** Tỷ lệ sống sót của các dòng ngô sau sàng lọc.

STT	Tên dòng	Số lượng cây được gieo	Số lượng cây sống sót	Tỷ lệ (%)
1	TV2	2310	6	0,260
2	TV3	1925	5	0,260
3	TV5	1650	8	0,485
4	TV9	1650	16	0,970
5	TV10	550	7	1,273
6	TV21	2750	16	0,582
7	TV31	2310	1	0,043
<b>Tổng</b>		<b>13145</b>	<b>59</b>	<b>0,449</b>

### Phân tích tính kháng hygromycin ở các cây chuyển gen

Để khẳng định kết quả phân tích cây chuyển gen, chúng tôi tiến hành đã tiến hành thí nghiệm đánh giá tính kháng hygromycin của mô lá các cây ngô đã chuyển gen. Lá của cây sống sót sau sàng lọc bằng chịu hạn có kết quả dương tính với phản ứng PCR và cây đối chứng không chuyển gen sau khi khử trùng được đặt vào môi trường MS có chứa 50mg/L hygromycin. Sau 5 ngày được đem ra quan sát mức độ kháng kháng sinh (Hình 4).

Trong môi trường chứa hygromycin, chúng tôi quan sát thấy mảnh lá của cây có mang gen *hpt* vẫn giữ được màu sắc tự nhiên, trong khi đó lá của những cây đối chứng không chuyển gen vàng và chết dần. Từ đó cho thấy, đây là một phương pháp chính xác, có thể kết hợp với phương pháp sàng lọc bằng điều kiện khô hạn để đánh giá cây chuyển gen trước khi tiến hành phân tích bằng PCR tránh tốn kém.

### Phân tích PCR cây chuyển gen

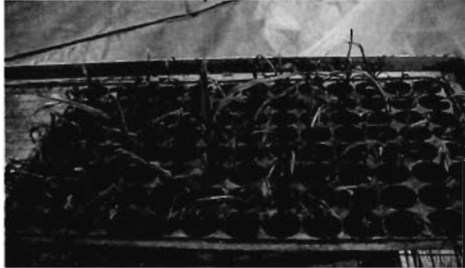
Phân tích PCR cho thấy, trong 59 mẫu DNA của những cây sống sót sau sàng lọc (Bảng 1) có 3 mẫu thuộc 2 dòng ngô TV2 và TV9 cho kết quả dương tính với kích thước băng DNA thu được là 1283 bp phù hợp với gen *ZmDREB2A* (Hình 5). Những cây ngô có kết quả dương tính với phản ứng PCR có kiểu hình khác biệt nhiều so với những cây còn lại. Điều này cho thấy, không có sự liên quan rõ rệt giữa kiểu hình không bình thường của cây chuyển gen với hoạt động promoter. Như vậy, điều kiện khô hạn có thể dùng để sàng lọc cây chuyển gen thông qua biểu hiện của gen *ZmDREB2A*, mặt khác lại gây nên dị dạng và sinh trưởng không bình thường ở cây ngô. Đây là một phương pháp tốt áp dụng cho sàng lọc khi được nghiên cứu tối ưu hóa hơn nữa. Sử dụng phương pháp này có thể loại bỏ hoàn toàn những lo ngại đối với sự tồn tại của các gen chỉ thị chọn lọc trong vấn đề cây chuyển gen.



A



B



C



D

**Hình 2.** Chọn lọc bằng điều kiện khô hạn. Cây non đang lớn (A), cây trong điều kiện khô hạn (B), phục hồi sau khi tưới trở lại (C), cây dị dạng (D).



A

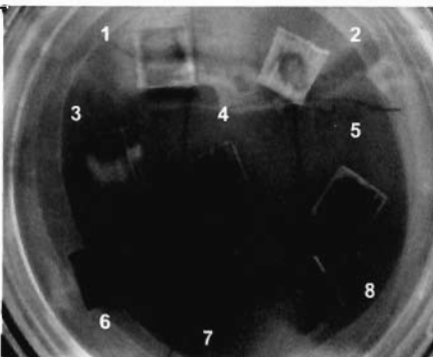


B

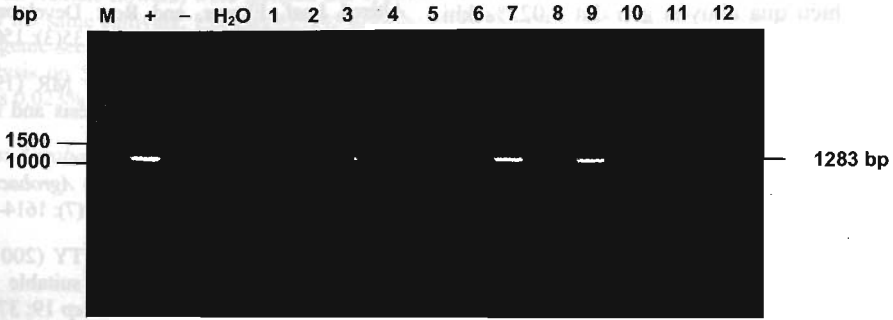


C

**Hình 3.** Bắp thu được của những cây sống sót sau sàng lọc bằng điều kiện khô hạn (A, B, C).



**Hình 4.** Mức độ kháng hygromycin của lá cây ngô sau 5 ngày. Lá của cây đối chứng không chuyển gen (1, 2), lá của cây đã được chuyển gen *hpt* (3, 4, 5, 6, 7, 8).



Hình 5. Kết quả phân tích PCR. Marker 1 kb (M); pBiG.ubi (+); cây không chuyển gen (-); H<sub>2</sub>O; TV2.1 (1); TV2.2 (2); TV2.3 (3); TV3.1 (4); TV3.2 (5) TV3.3 (6); TV9.1 (7); TV9.2 (8), TV9.3 (9); Các cây chuyển gen khác (10, 11, 12...59)

Trên cơ sở kết quả thu được, chúng tôi thấy rằng tỷ lệ cây sống sót mang gen *ZmDREB2A* đạt 0,023%, thấp hơn so với báo cáo khác khi sử dụng cùng phương pháp chuyển gen nguyên cây (Chumakov *et al.*, 2006). Tuy nhiên, tác giả cũng cho biết rằng, phương pháp này có sự dao động lớn và khó lặp lại. Với sự khác biệt về thời tiết, giống ngô được dùng để biến nạp cũng như chủng *A. tumefaciens* có thể là nguyên nhân dẫn tới sự khác nhau trong kết quả.

Thí nghiệm chuyển gen nguyên cây được tiến hành ngay trên đồng ruộng, chịu ảnh hưởng nhiều của điều kiện thời tiết, đặc biệt là các yếu tố như nhiệt độ, độ ẩm, mưa, cường độ ánh sáng... Những tác động của điều kiện ngoại cảnh là yếu tố chính làm cho hiệu quả chuyển gen của phương pháp này thấp: Mặc dù hiệu quả chuyển gen thấp (chỉ đạt 0,023%) nhưng với việc thu được cây chuyển gen T<sub>0</sub> với số lượng lớn, chuyển gen nguyên cây sẽ là một phương pháp có nhiều triển vọng trong tương lai. Tuy nhiên, cần giải quyết một vấn đề đặt ra là tối ưu hóa các yếu tố có thể ảnh hưởng tới hiệu quả của phương pháp chuyển gen nguyên cây như chủng vi khuẩn, nồng độ acetosyringone, pH, thành phần môi trường nuôi khuẩn. Đồng thời hạn chế ảnh hưởng của các yếu tố nhiệt độ, mưa, cường độ ánh sáng ... trong quá trình biến nạp gen.

Trong thời gian gần đây, những phương pháp chuyển gen truyền thống ở ngô cũng đang thu được nhiều thành tựu đáng kể. Chuyển gen vào phôi ngô non thu được biểu hiện tạm thời của gen *gus* đạt xấp

xi 50% ở dòng mô hình A188 (Ishida *et al.*, 2007), chuyển gen vào callus tạo thành từ các mô khác nhau cũng đã thu được cây chuyển gen (Ahmadabadi *et al.*, 2007; Sidorov *et al.*, 2006).

Tại Việt Nam, trong thời gian gần đây các nghiên cứu chuyển gen vào ngô theo hướng này cũng đã được chú ý. Biểu hiện *gus* tạm thời sau khi chuyển gen vào phôi non ở dòng ngô HR8 thu được khá cao (từ 49,3 - 54,9%) (Phạm Thị Lý Thu, 2007). Mặc dù vậy, những nghiên cứu kể trên vẫn còn gặp nhiều khó khăn do phương pháp chuyển gen chỉ áp dụng được với những dòng mô hình, đòi hỏi quy trình nuôi cấy phức tạp, nguồn vật liệu ban đầu hạn chế và cây chuyển gen rất khó duy trì trong điều kiện Việt Nam. Hơn thế nữa, sau khi nhận được cây chuyển gen mô hình, muốn có được các dòng/giống ngô của Việt Nam, nhà chọn giống phải mất thời gian và công sức để tiến hành các phép lai ngược nhằm chuyển gen quan tâm từ các dòng chuyển gen mô hình sang các giống ngô Việt Nam.

Vì thế, phương pháp chuyển gen nguyên cây vào các dòng/giống ngô chiến lược Việt Nam mà chúng tôi trình bày trong báo cáo này có thể là một trong những phương pháp lý tưởng khắc phục được những hạn chế nêu trên.

## KẾT LUẬN

Chuyển gen vào ngô nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* thông qua hệ thống sinh

sản cái bước đầu đã thu được một số kết quả. Vào vụ đông - xuân, hiệu quả chuyển gen đạt 0,023% khi biến nạp bằng chủng EHA105 mang vector pBiG.ubi vào các dòng ngô Việt Nam.

Các yếu tố có ảnh hưởng đến quá trình biến nạp gen vào ngô theo phương pháp chuyển gen nguyên cây cần được tiếp tục nghiên cứu, tối ưu và hoàn thiện.

**Lời cảm ơn:** Tập thể tác giả xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới GS Kazuko Y-S Phòng Tài nguyên sinh vật, Trung tâm nghiên cứu quốc tế về Khoa học Nông nghiệp Nhật Bản (JIRCAS) đã cung cấp vector pBiGubi (promoter Ubiquitin, gen chịu hạn - ZmDREB2A và hpt - kháng hygromycin). Chúng tôi cũng xin chân thành cảm ơn GS Chumakov MI, Viện Hóa sinh - Sinh lý Thực vật và Vi sinh vật, Viện Khoa học Nga, đã giúp đỡ chúng tôi hoàn thành tốt nghiên cứu này.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

Ahmadabadi M, Ruf S, Bock R (2007) A leaf-based regeneration and transformation system for maize (*Zea mays* L.). *Transgenic Res* 16(4): 437-448.

Bechtold N, Ellis J, Pelletier G (1993) In planta *Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *C R Acad Sci Paris Life Sci* 316: 1194-1199.

Chumakov MI, Rozhock NA, Velikov VA, Tyrnov VS, Volokhina IV (2006) *Agrobacterium*-mediated in planta transformation of maize via pistil filaments. *Genetika* 42(8): 893-897.

Ge L, Chen H, Jian J-F, Zhao Y, Xu M-L, Xu Y-Y, Tan K, Chong K (2004) Overexpression of *OsRAA1* Causes

Pleiotropic Phenotypes in Transgenic Rice Plants, including Altered Leaf, Flower, and Root Development and Root Response to Gravity. *Plant Physiol* 135(3): 1502-1513.

Hodges TK, Kamo KK, Becwar MR (1986) Genotype specificity of somatic embryogenesis and regeneration in maize. *Biotechnol* 4: 219-223.

Ishida Y, Hiei Y, Komari T (2007) *Agrobacterium*-mediated transformation of maize. *Nat Protoc* 2(7): 1614-1621.

Lin RC, Dinh ZS, Li LB, Kuang TY (2001) A rapid and efficient DNA minipreparation suitable for screening transgenic plants. *Plant Mol Biol Rep* 19: 379a-379e.

Phạm Thị Lý Thu (2007) Nghiên cứu xây dựng hệ thống tái sinh từ phôi non và xác định phương pháp chuyển gen thích hợp ở ngô. *Luận án Tiến sĩ sinh học, Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam.*

Qin F, Kakimoto M, Sakuma Y, Maruyama K, Kazuko Y-S (2007). Regulation and functional analysis of *ZmDREB2A* in response to drought and heat stresses in *Zea mays* L. *Plant J* 50: 54-69.

Sakuma Y, Maruyama K, Osakabe K, Quin F, Seki M, Shinozaki K, Kazuko Y-S (2006a) Functional analysis of an Arabidopsis transcription factor, DREB2A, involved in drought-responsive gene expression. *Plant Cell* 18: 1292-1309.

Sidorov V, Gilbeertson L, Addae P, Duncan D (2006) *Agrobacterium*-mediated transformation of seedling-derived maize callus. *Plant Cell Rep* 25: 320-328.

Wang M-B, Waterhouse PM (1997) A rapid and simple method of assaying plants transformation with hygromycin or PPT resistance. *Plant Mol Biol Rep* 15: 209-215.

Weeks JT, Ye J, Rommens CM (2008) Development of an in planta method for transformation of alfalfa (*Medicago sativa*). *Transgenic Res* 17(4): 587-597.

## STUDY ON *IN PLANTA* TRANSFORMATION IN MAIZE

Dinh Van Trinh, Pham Thi Ly Thu, Le Thi Thu Ve, Nguyen Van Toan, Nguyen Van Dong\*

*Institute of Agricultural Genetics*

### SUMMARY

Almost transformation methods in maize (*Zea mays* L.) require multiple tissue culture manipulations that are time-consuming and expensive. Furthermore, these only can apply to a few highly regenerative genotypes. The first time in Vietnam, we applied a simple *in planta* method that makes it possible to transfer commercial variety through female reproductive system. The *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105 which contains plasmid pBiG.ubi carrying drought tolerant gene - *ZmDREB2A* and hygromycin resistant gene - *hpt* was used.

\* Author for correspondence: Tel: 84-4-37557161; Fax: 84-4-37543196; E-mail: [dongjircas@yahoo.com](mailto:dongjircas@yahoo.com)

Maize' silks (female flowers) were isolated and applied with bacterium suspension before pollinating with the pollens of the same cultivars. 135 ears (13145 kernels) of T<sub>0</sub> harvested in the winter-spring crop 2006 - 2007. The transgenic seedlings at 2 - 3 leaves state were selected by drought stress. Hygromycin resistant assay and PCR analysis on 59 plants (T<sub>0</sub>) survived after drought selection showed the transformation efficiency of T<sub>0</sub> plants was 0.023%.

**Keywords:** *Agrobacterium tumefaciens*, drought tolerance, in planta transformation, *Zea mays L.*, *ZmDREB2A*

#### SUMMARY

Transgenic maize silks were cultured on Murashige and Skoog (MS) medium supplemented with 2,4-dichlorophenoxy-acetic acid (2,4-D) and hygromycin (Hyg) as selection agent. The explants were cultured on MS medium supplemented with 2,4-D (1 mg l<sup>-1</sup>) and Hyg (100 mg l<sup>-1</sup>) for 2 weeks. The explants were cultured on MS medium supplemented with 2,4-D (1 mg l<sup>-1</sup>) and Hyg (100 mg l<sup>-1</sup>) for 2 weeks. Rooting was observed after 2 weeks. The results demonstrated that the explants from the edge of explants were more suitable for in vitro culture. The results also demonstrated that the explants from the edge of explants were more suitable for in vitro culture.

**Keywords:** *Brassica*

#### INTRODUCTION

Cauliflower is a vegetable crop of numerous value.

Department of Agriculture provides 77% of the total protein (DRI) of vegetable, dietary fiber, vitamin B<sub>6</sub>, calcium and iron. It is a small amount of minerals.

The low price of cauliflower is the use of cloned material supports on this important crop in vitro propagation of cauliflower explants (Vardavas et al., 1995; Arora et al., 1996; culture (Delgado, Boyan, 1994) and another culture (Yan, different explants from vegetative branch, leaf, leaf rib) and floral bud, flower bud and card) tissues in explants were also used for in vitro propagation of cauliflower (Nikola, 1999).

Our previous research reported that "thin layer" explants from the surface of floral branches