

CHUYỂN GEN *SSIV* VÀO MÔ SẸO PHÔI HÓA CỦA GIỐNG SẮN KM140 THÔNG QUA VI KHUẨN *AGROBACTERIUM TUMEFACINES*

Nguyễn Thị Minh Hồng¹

TÓM TẮT

Hiện nay, việc sử dụng công nghệ gen sẽ là hướng đi góp phần thúc đẩy mục tiêu cải thiện năng suất tinh bột ở cây sắn. Các starch synthase (SS) của thực vật bậc cao mã hóa bởi 5 nhóm gen ký hiệu là GBSS (granule - bound starch synthase), SSI, SSII, SSIII, và SSIV. Trong đó, mỗi biến thể enzyme SS có các cấu thành khác nhau và có vai trò nhất định trong tổng hợp amylopectin, trong đó SSIV có thể làm tăng kích thước hạt tinh bột và hàm lượng tinh bột. Trong nghiên cứu này, gen SSIV phân lập từ giống sắn KM140 được chèn vào vector pBI121-C54:SSIV:NOST và chuyển vào mô sẹo phôi hóa (FEC) của giống sắn KM140 thông qua A. tumefaciens. Kết quả thu được 7 dòng cây sắn chuyển gen chứa cấu trúc mang gen chuyển SSIV. Các dòng chuyển gen tiếp tục được phân tích ở các thế hệ tiếp theo.

Từ khoá: *Chuyển gen, tinh bột, cây sắn, SS (starch synthase), SSIV.*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Quá trình sinh tổng hợp tinh bột ở thực vật được bắt đầu từ việc chuyển hoá glucose-1-P và ATP thành ADP - glucose dưới sự xúc tác của ADP - glucose - pyrophosphorylase (AGPase). ADP - glucose là một monomer cho quá trình sinh tổng hợp tinh bột với sự tham gia của nhiều enzyme tiếp theo. GBSS đảm nhận quá trình tổng hợp amylose và SS (I - IV) giữ vai trò sinh tổng hợp nên amylopectin. Ngoài ra, bên cạnh các enzyme SS, còn có các enzyme xúc tác quá trình phân nhánh SBE (Starch branching enzyme) hay enzyme phân huỷ tinh bột tham gia vào quá trình điều hoà hàm lượng tinh bột ở thực vật [4].

Các biến thể khác nhau của SS (thường gọi là SS hòa tan) tạo ra các chuỗi amylopectin (1 dạng tinh bột đã polyme hóa) có thể tan trong các plastic hoặc một phần hòa tan và một phần gắn với hạt tinh bột. Số liệu di truyền và sinh hóa chỉ ra rằng mỗi biến thể enzyme SS có các cấu thành khác nhau và vai trò nhất định trong tổng hợp amylopectin. Nhóm gen SS (SSI, SSII, SSIII và SSIV), trong đó các isoenzyme SSI, SSII, SSIII liên quan đến sự kéo dài các chuỗi amylopectin và SSIV có liên quan đến sự khởi đầu hình thành và kiểm soát số lượng hạt tinh bột. Vì vậy, SS là đối tượng nghiên cứu tiềm năng trong quá trình tạo ra các cây trồng có hàm lượng tinh bột cao với việc sử dụng công nghệ gen. Tuy nhiên, việc biểu hiện của gen SS lại đang ít khi được sử dụng để làm tăng quá trình tích lũy tinh bột. Điều này, chủ yếu là do sự hiện diện khác nhau của các lớp enzym SS trong cây trồng, chúng tương tác với nhau tạo thành phức hợp protein và giữ vai trò cụ thể trong quá trình kiến tạo nên các hạt tinh bột [4; tr.1566 - 1577]. Do đó, những thay đổi trong việc biểu hiện một SS

¹ Khoa Nông - Lâm - Ngư nghiệp, Trường Đại học Hồng Đức

đơn lẻ có thể dẫn đến các hiệu ứng sâu sắc và khó lường không chỉ trong cấu trúc của hạt tinh bột mà còn trong hàm lượng tinh bột. Bên cạnh đó các đồng phân SS có vai trò đặc trưng nhưng phụ thuộc lẫn nhau trong quá trình tổng hợp tinh bột. Phân tích việc phân phối chiều dài chuỗi amylopectin trong các cây đột biến và cây chuyển gen mất các biến thể enzyme SS đặc trưng đã dẫn tới kết luận rằng nhóm SSI, SSII, và SSIII đóng vai trò lần lượt trong việc kéo dài các chuỗi ngắn, trung bình và dài [10].

Việc cải tiến các giống sản bằng kỹ thuật chuyển gen nhằm tăng năng suất, tăng hàm lượng protein, hàm lượng tinh bột và giảm acid cyanhydric là vấn đề đang được quan tâm trên toàn thế giới. Để tạo được cây sản chuyển gen thì việc nghiên cứu khả năng tái sinh ở các giống sản là rất cần thiết. Bên cạnh một số hệ thống tái sinh cây sản thông qua quá trình tạo phôi soma đã được nghiên cứu cải tiến [7; tr.731-735], phương pháp nhân nhanh mô sẹo từ các mô sản trên môi trường bổ sung picloram đã được chứng minh là có khả năng tạo một lượng lớn phôi soma [8; tr.726-730]. Ngoài ra, việc thay đổi nồng độ auxin và quá trình chuyển đổi môi trường giữa lòng, rắn cũng ảnh hưởng đến tỷ lệ sống sót các phôi soma. Bên cạnh đó mô sẹo phôi hóa (Friable embryogenic callus - FEC) là mô khi tái sinh sẽ tạo ra tỷ lệ chồi bình thường cao nhất so với các cấu trúc mô khác. Tỷ lệ hình thành phôi soma đạt cao nhất ($82 \pm 1,7\%$) ở giống sản KM94 trên môi trường MS + 12 mg/l picloram [1; tr.527-533]. Gần đây, một số nhà khoa học trên thế giới đã sử dụng các bộ phận khác nhau trên thân cây sản làm nguồn nguyên liệu tạo mô sẹo và các loại phôi soma. Mô sẹo phôi hóa sử dụng làm nguyên liệu trong chuyển gen thông qua *A.tumefaciens* cho hiệu suất chuyển gen cao [3; tr.1845-1854]. Việc tạo ra những phôi soma chất lượng là yếu tố rất quan trọng để cải tạo giống sản bằng các phương pháp công nghệ sinh học [6, 9]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã có những kết quả bước đầu chuyển gen SSIV vào giống sản KM140 của Việt Nam.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu thực vật

Giống sản KM140 do Trung tâm nghiên cứu thực nghiệm nông nghiệp Hưng Lộc, Viện Khoa học kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam cung cấp.

Chủng vi khuẩn

Chủng vi khuẩn *E.coli* DH5 α được sử dụng để nhân dòng gen SSIV và chủng vi khuẩn *A.tumefaciens* C58 PGV2260 do Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học cung cấp.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Chuyển gen vào mô sẹo cây sản thông qua vi khuẩn A. tumefaciens

Đỉnh chồi, mảnh lá, cuống lá được đưa vào môi trường CP, CD cảm ứng tạo mô sẹo (2 - 3 tuần). Mô sẹo được chuyển sang môi trường CI₁₋₄ để tạo phôi cung cấp nguyên liệu phục vụ cho chuyển gen (4 - 8 tuần). Lựa chọn phôi ở giai đoạn phôi non, khối mô vàng tươi, tua dài lây nhiễm với dịch huyền phù *A. tumefaciens* có bổ sung 100 μ M AS trong

10 - 20 phút và đặt trên môi trường đồng nuôi cấy CI_{1-4} có bổ sung $100\mu\text{M}$ AS trong 2 ngày, để tối ở nhiệt độ phòng $25 - 27^\circ\text{C}$. Sau đó chuyển phôi lên môi trường nuôi cấy chọn lọc CI_{1-4} có bổ sung 500 mg/l cefotaxime, $40 - 100\text{ mg/l}$ Km, cấy chuyển hai tuần/ lần cho tới khi chồi sản tái sinh. Phôi soma sống sót được nuôi cấy trên môi trường tái sinh chồi CN_{1-4} có bổ sung $50 - 100\text{ mg/l}$ Km, nhiệt độ $25 - 27^\circ\text{C}$ (6 - 8 tuần). Chồi sản tái sinh được chọn lọc trên môi trường ra rễ chọn lọc (MR) là môi trường MS bổ sung $50 - 100\text{ mg/l}$ Km, nhiệt độ $25 - 27^\circ\text{C}$ để chọn lọc cây chuyển gen. Những chồi sống sót được chuyển sang môi trường MS để cây sinh trưởng, phát triển. Khi cây đạt chiều cao 7 - 8 cm, cây có 4 - 5 lá với bộ rễ khỏe mạnh được trồng trong bầu cùng với giá thể TN1 và đặt trong bồn sinh trưởng.

Xác định nồng độ Kanamycin thích hợp để chọn lọc cây chuyển gen

Các chồi non in vitro của giống sản KM140 cao khoảng 1 - 1,5cm được nuôi cấy trên môi trường chọn lọc và môi trường MS bổ sung Km với các nồng độ 0, 40, 60, 80, 100mg/l. Mỗi thí nghiệm được tiến hành với 3 lần lặp lại, mỗi lần 20 mẫu.

Phương pháp PCR phân tích sự có mặt của gen chuyển

Các dòng cây chuyển gen sau khi trồng trên giá thể đất mùn khoảng 1 tháng có 2 - 3 lá mới, tiến hành thu lá để tách DNA tổng số và thực hiện phản ứng PCR.

DNA được tách theo phương pháp Garvel. DNA tổng số (0,2 - $1\mu\text{g}$) của các dòng thuốc lá chuyển gen được sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR. Đồng thời, vector chuyển gen mang các cấu trúc gen chuyển cũng được sử dụng làm đối chứng dương cho phản ứng, mỗi đặc hiệu được chọn cho từng gen. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 0,8%.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

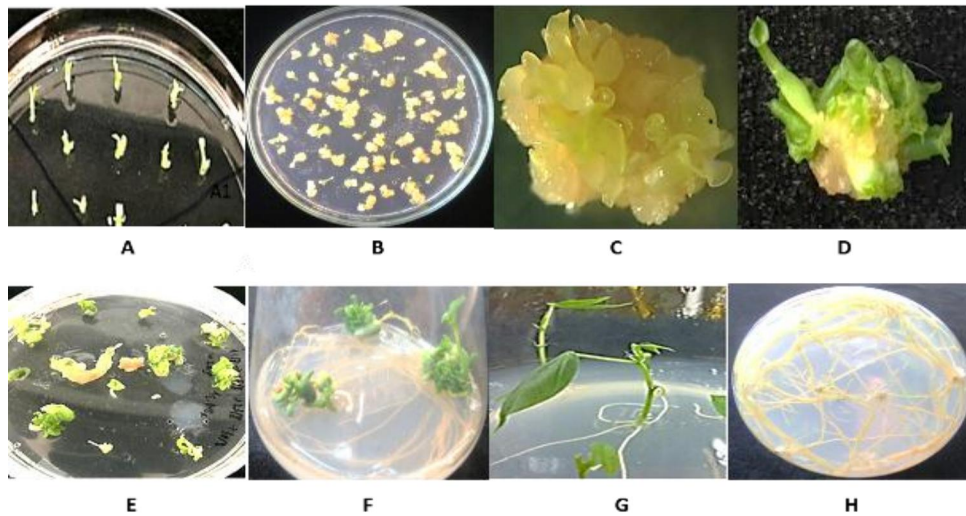
3.1. Tạo dòng sản chuyển gen pBI121-C54:SSIV:NOST

Chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* C58 mang cấu trúc vector chuyển gen *pBI121-C54:SSIV:NOST* được biến nạp vào các khối mô sẹo phôi hóa (FEC) theo quy trình chuyển gen đã được mô tả ở phần phương pháp nghiên cứu, kết quả biến nạp trên 1520 mẫu thu được kết quả ở bảng 1.

Bảng 1. Chuyển gen pBI121-C54: SSIV:NOST vào giống sản KM140

Lô thí nghiệm	Số mẫu	Số mẫu tạo mô sẹo trên MT CP	Số mẫu tạo phôi trên MT CI	Số mô sống sót trên MTCL			Số chồi ra rễ trên MTMS
				CI	CN	MR	
ĐC	50	50	36	12	0	0	0
1	300	297	207	121	7	3	2
2	350	350	249	134	8	4	2
3	300	300	236	115	9	5	2
4	270	265	195	107	7	3	1
5	250	250	188	95	8	3	2
Tổng	1520	1512	1111	572	39	18	9

Chú thích: ĐC: mẫu không nhiễm A. tumefaciens, MTCL: CI; CN: bổ sung 60 mg/l Km; MR: bổ sung 50 mg/l Km



Hình 1. Một số hình ảnh chuyển gen pBI121-C54: SSIV:NOST vào giống sắn KM140

Chú thích: A: Đỉnh sinh trưởng trên môi trường tạo mô sẹo CP; B: Mô sẹo trên môi trường CI; C: Phôi làm vật liệu chuyển gen; D,E: Mẫu trên môi trường chọn lọc CI + cefo 500mg/l + Km 60mg/l; F, G: Mẫu trên môi trường tái sinh CN + Km 60 mg/l; H: Mẫu trên môi trường ra rễ MR + Km 50 mg/l

Những cây sắn chuyển gen *SSIV* mang vector *pBI121-C54: SSIV:NOST* nuôi cấy ở môi trường MS trong 3 - 4 tuần, có 4 - 5 lá, lá xanh đậm, cao 7 - 8 cm với bộ rễ khỏe mạnh được đưa ra trồng trong bầu cùng với giá thể TN1 đặt vào bồn sinh trưởng 2 - 3 tuần. Các cây chuyển gen sinh trưởng phát triển bình thường, không có sự khác biệt về hình thái khi quan sát cây chuyển gen với cây không chuyển gen (Hình 2). Sau đó chuyển những cây này sang chậu lớn, trồng trong nhà lưới, và tiếp tục tiến hành theo dõi.



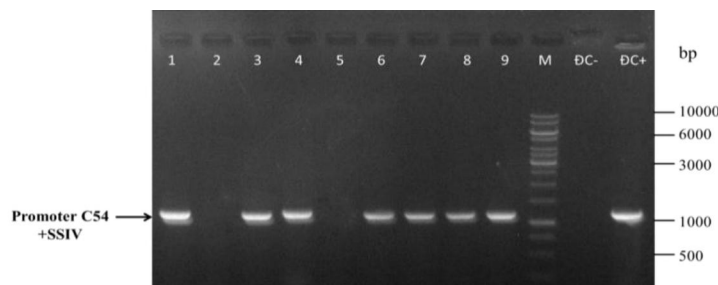
Hình 2. Cây sắn giống KM 140 chuyển gen *SSIV* mang vector pBI121-C54: SSIV:NOST được trồng ở nhà lưới

Chú thích: WT: Cây sắn không chuyển gen; 1-9: Cây sắn chuyển gen

3.2. Phân tích và đánh giá các dòng sắn chuyển gen bằng kỹ thuật PCR

Thu rễ từ các cây sắn chuyển gen mang cấu trúc *pBI121-C54: SSIV:NOST* để tách DNA tổng số và dùng để phân tích PCR. Kết quả điện di cho thấy DNA tổng số của các dòng sắn chuyển gen đạt tiêu chuẩn để dùng cho phản ứng PCR. Phản ứng PCR được thực hiện với cặp mồi promoter *C54-F/SSIV Frag-R*. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR của

các dòng sản chuyển gen mang cấu trúc *pBI121-C54:SSIV:NOST* được thể hiện ở hình 3. Kết quả cho thấy rằng 7/9 dòng sản được kiểm tra có mang cấu trúc gen *SSIV*. Các dòng này cho kết quả PCR dương tính và sản phẩm là đoạn DNA có kích thước tương ứng là 1289 bp.

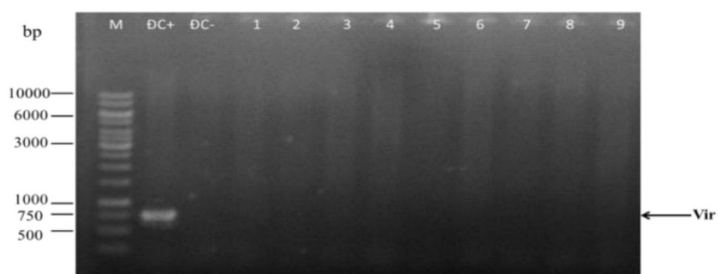


Hình 3. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR các dòng sản chuyển gen với cặp mồi promoter C54F/ SSIV-R

Chú thích: M: thang DNA chuẩn 1 kb (ThermoScientific; ĐC (-): cây không chuyển gen; ĐC(+): Plasmid mang gen chuyển; 1-9: Các cây sản chuyển gen SSIV. Các cây dương tính 1,3,4,6,7,8,9.

Song song với việc PCR với cặp mồi Promoter C54-F/ SSIV-R, để chắc chắn rằng các dòng sản chuyển gen không có sự tồn tại của khuẩn *A. tumefaciens* trong cây, chúng tôi sử dụng DNA tổng số của các dòng sản chuyển gen này tiếp tục được dùng cho phản ứng PCR với cặp mồi *virF/R* (Hình 4).

Kết quả điện di sản phẩm PCR các dòng sản chuyển gen cho thấy rằng tất cả các dòng sản chuyển gen đều cho kết quả âm tính với cặp mồi *virF/R*. Điều này chứng tỏ rằng không có sự tồn tại của *A. tumefaciens* trong các dòng sản chuyển gen này. Bước đầu khẳng định gen *SSIV* đã được chuyển vào cây sản giống KM140 thành công.



Hình 4. Điện di kiểm tra sản phẩm PCR các dòng sản chuyển gen với cặp mồi *virF/R*

Chú thích: M: thang DNA chuẩn 1 kb (ThermoScientific; ĐC (-): cây không chuyển gen; ĐC(+): Plasmid mang gen chuyển; 1-9: Các cây sản chuyển gen SSIV.

Gen *SSIV* được cho là có liên quan đến Pt2L4 - một protein giàu acid glutamic ở cây sản, sự phiên mã của gen này chỉ phát hiện được ở rễ củ và không có ở lá. Kết quả cho thấy promoter C54 hoạt động chủ yếu ở mạch dây, tầng phát sinh gỗ và mạch gỗ của mô mạch ở lá, cuống lá, thân và hệ thống rễ. Đặc biệt, sự biểu hiện mạnh của β -glucuronidase được phát hiện trong các tế bào nhu mô giàu tinh bột ở rễ dự trữ của cây chuyển gen. Những kết quả này chứng minh promoter C54 liên quan đến sự biểu hiện đặc hiệu ở mô mạch và quá trình phát triển thứ cấp của rễ củ ở sản. Như vậy, C54 là một promoter tiềm

năng trong biểu hiện gen đặc hiệu nhằm cải thiện tính trạng di truyền ở cây sắn, ví dụ như tăng giá trị dinh dưỡng của củ. Trong nghiên cứu trước, chúng tôi đã trình bày kết quả phân tích khả năng tích lũy tinh bột ở cây thuốc lá khi chuyển gen *pK7WG2D-35S:SSIV:T35S* và *pBI121-C54:SSIV:NOST*. Hàm lượng tinh bột trong rễ tăng 6,8 - 17,6% ở những cây thuốc lá chuyển gen mang cấu trúc *pK7WG2D-35S:SSIV:T35S* và tăng 27,7 - 65,7% ở những cây thuốc lá chuyển gen mang cấu trúc *pBI121-C54:SSIV:NOST* [2]. Đây chính là cơ sở tạo cây sắn chuyển gen *SSIV* và hứa hẹn ứng dụng thành công kỹ thuật chuyển gen trong tạo dòng cây sắn chuyển gen chứa cấu trúc *pBI121-C54:SSIV:NOST* có sự tăng tích lũy tinh bột ở củ.

4. KẾT LUẬN

Cấu trúc *pBI121-C54:SSIV:NOST* đã được chuyển thành công vào giống sắn KM140 qua mô sẹo phôi hóa nhờ *A.tumefaciens* với tỷ lệ cây chuyển gen đạt 0,46%. Các dòng cây chuyển gen tiếp tục được phân tích sự biểu hiện *SSIV* tái tổ hợp và đánh giá chức năng sinh học ở các thế hệ tiếp theo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Đỗ Xuân Đồng, Đỗ Hải Lan, Phạm Bích Ngọc, Lê Văn Sơn, Lê Trần Bình, Chu Hoàng Hà (2012), *Nghiên cứu hệ thống tái sinh cây sắn (Manihot esculenta Crantz) thông qua phôi soma từ đỉnh chồi*, Tạp chí Công nghệ Sinh học 10 (3).
- [2] Nguyễn Thị Minh Hồng, Lê Thu Ngọc, Nguyễn Khắc Hưng, Nguyễn Thị Thom, Phạm Bích Ngọc (2017), *Nghiên cứu tạo cây thuốc lá chuyển gen SSIV tăng cường sinh tổng hợp tinh bột thông qua Agrobacterium tumefaciens*, Tạp chí Khoa học ĐHQGHN, Khoa KHTN và CN, 33(1S): 224 - 230.
- [3] Bull SE, Owiti JA, Niklaus M, Beeching JR, Gruissem W, Vanderschuren, H. (2009) *Agro - mediated transformation of friable embryogenic calli and regeneration of transgenic cassava. Nat. Protoc.* 4, 1845-1854.
- [4] Geigenberger P (2011), *Regulation of starch biosynthesis in response to a fluctuating environment*, Plant physiology 15: 1566 - 1577.
- [5] Hennen-Bierwagen TA, Lin Q, Grimaud F (2008), *Starch biosynthetic enzymes from develop Zea mays endosperm associate in multisubunit complexes*, Plant Physiol 146:1892 - 1908.
- [6] Nyaboga EN, Njiru JM and Tripathi L (2015), *Factors influencing somatic embryogenesis, regeneration, and Agrobacterium - mediated transformation of cassava (Manihot esculenta Crantz) cultivar TME14*, Front Plant Sci 6: 411.
- [7] Schopke C, Taylor N, Ca'rcamo R, Konan NK, Marmey P, Henshaw GG, Beachy RN, Fauquet C (1996), *Regeneration of trans-genic cassava plants (Manihot esculenta Crantz) from microbom - barded embryogenic suspension cultures*, Nat Biotechnol 14: 731 - 735.

- [8] Taylor NJ, Edwards M, Kiernan RJ, Davey CDM, Blakesley D, Henshaw GG (1996), *Development of friable embryogenic callus and embryogenic suspension culture systems in cassava (Manihot esculenta Crantz)*, *Nat Biotechnol* 14: 726 - 730.
- [9] You-Zhi Li, Jian-Yu Zhao, San-Min Wu, Xian-Wei Fan, Xing-Lu Luo & Bao-Shan Chen (2016), *Characters related to higher starch accumulation in cassava storage roots*, *Scientific reports*. Doi:10:1038.
- [10] Zeeman & Samuel C (2010), *Starch: Its Metabolism, Evolution, and Biotechnological Modification in Plants*, *Annual Review of Plant Biology* 61(1).

AGROBACTERIUM-MEDICATED TRANSFORMATION OF THE SSIV GENE TO FRIABLE EMBRYOGENIC CALLI FROM KM140 CASSAVA VARIETY WITH THE HELP OF BACTERIA

Nguyen Thi Minh Hong

ABSTRACT

Currently, gene technology would be the best method to improve starch productivity in cassava. Starch synthase (SS) enzymes are coded by five gene groups, named GBSS (granule-bound starch synthase), SSI, SSII, SSIII, and SSVI. In which, each (SS) enzyme variant has different components and has a certain role in amylopectin synthesis, specifically, SSIV gene would be used to increase the size and content of starch granules. In this study, SSIV gene was isolated from KM140 cassava variety, inserted into pBI121-C54:SSIV:NOST vector and transformed to friable embryogenic callus (FEC) via Agrobacterium tumefaciens. Seven transgenic cassava strains which had positive results with PCR testing were formed as the intinial results.

Keywords: *Gene transference, starch, cassava, SS (starch synthase), SSIV.*

* Ngày nộp bài: 27/3/2019; Ngày gửi phản biện: 28/3/2019; Ngày duyệt đăng: 4/3/2020

* *Lời cảm ơn: Công trình được hoàn thành với sự hỗ trợ kinh phí của đề tài “Khai thác và phân lập nguồn gen có sẵn của tập đoàn giống sắn Việt Nam nhằm phát triển các giống sắn có khả năng chống chịu bệnh và năng suất cao bằng công nghệ gen” thuộc nhiệm vụ hợp tác quốc tế về khoa học và công nghệ. Các thí nghiệm này được thực hiện tại Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam.*