

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM

Ngô Mạnh Dũng

**NGHIÊN CỨU CHUYỂN GEN *codA* NHẪM NÂNG CAO
KHẢ NĂNG CHỊU HẠN CỦA CÂY ĐẬU TƯƠNG
(*Glycine max* (L.) Merrill)**

**Ngành: Di truyền học
Mã số: 9420121**

TÓM TẮT LUẬN ÁN TIẾN SĨ SINH HỌC

THÁI NGUYÊN - 2021

Công trình được hoàn thành tại :
Trường Đại học Sư phạm - Đại học Thái Nguyên

Người hướng dẫn khoa học: 1. PGS. TS. Chu Hoàng Hà
2. GS.TS. Chu Hoàng Mậu

Phản biện 1:

Phản biện 2:

Phản biện 3:

Luận án được bảo vệ trước Hội đồng đánh giá luận án cấp Trường
hợp tại: Trường Đại học Sư phạm-Đại học Thái Nguyên
Vào hồi giờ phút, ngày tháng năm 2021

Có thể tìm hiểu luận án tại:

1. Thư viện Quốc gia Việt Nam
2. Trung tâm học liệu Đại học Thái Nguyên
3. Thư viện Trường Đại học Sư phạm – Đại học Thái Nguyên

MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Biến đổi khí hậu, nước biển dâng đang diễn ra trên quy mô toàn cầu dẫn tới tình trạng hạn hán, đặc biệt là hạn mặn ngày càng kéo dài, gây khó khăn lớn cho ngành sản xuất nông nghiệp. Stress hạn gia tăng đã trở thành một trở ngại lớn, gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến năng suất và sản lượng nông nghiệp toàn cầu.

Đậu tương là một trong những cây nông nghiệp quan trọng trên thế giới, là nguồn cung cấp protein bổ dưỡng với chi phí thấp và giữ vai trò cải tạo đất trong nông nghiệp. Cây đậu tương thuộc nhóm cây trồng chịu hạn kém. Stress hạn là nguyên nhân chính làm giảm năng suất, sản lượng đậu tương. Trong bối cảnh hiện nay, vấn đề nâng cao khả năng chịu hạn ở cây đậu tương để giảm thiểu thiệt hại năng suất trong điều kiện môi trường thiếu nước là nhiệm vụ cấp bách của các nhà chọn giống nông nghiệp.

Việc cải thiện khả năng chịu hạn của cây đậu tương được quan tâm nghiên cứu với nhiều hướng tiếp cận khác nhau, trong đó, kỹ thuật chuyển gen mở ra triển vọng lớn trong việc cải thiện đặc tính chịu hạn của cây đậu tương. Đặc tính chịu hạn là tính trạng số lượng phức tạp, chịu ảnh hưởng của một hệ thống các gen mục tiêu. Sự biểu hiện gen tác động trực tiếp đến đặc tính chịu hạn hoặc điều hòa chức năng nhóm gen chịu hạn... Một trong các hướng nghiên cứu tiếp cận cơ chế chống chịu hạn hiện nay chính là làm gia tăng các chất giúp bảo vệ áp suất thẩm thấu của tế bào khỏi sự mất cân bằng về nước. Trong đó, glycine betaine (GB) là một trong những chất bảo vệ thẩm thấu được nghiên cứu rộng rãi nhất. Một số cây trồng chuyển gen mã hoá enzyme liên quan đến sinh tổng hợp GB cũng thể hiện khả năng chống chịu với các điều kiện bất lợi của môi trường như chịu nóng, chịu lạnh, chịu hạn và chịu mặn.

Phương pháp chuyển gen *codA* từ *A. globiformis* vào các loại cây trồng như đậu xanh, khoai tây, cà chua... để nâng cao khả năng chống chịu trong các điều kiện stress phi sinh học khác nhau được chứng minh phương pháp đơn giản và hiệu quả. Tại Việt Nam, gen *codA* mã hoá sinh tổng hợp GB đã được chuyển thành công vào cây xoan, thuốc lá cho thấy khả năng chịu hạn, chịu mặn. Chính vì vậy, việc nghiên cứu tăng cường biểu hiện gen *codA* liên quan đến

sinh tổng hợp GB nhằm nâng cao khả năng chịu hạn ở đậu tương giúp cây phát triển tốt hơn, cho năng suất và sản lượng cao hơn trong điều kiện môi trường bất lợi là nghiên cứu mang tính thực tiễn và cần thiết.

Xuất phát từ cơ sở khoa học và nhu cầu thực tiễn về tạo giống đậu tương có khả năng chống chịu hạn bằng công nghệ chuyển gen, chúng tôi lựa chọn thực hiện đề tài luận án “Nghiên cứu chuyển gen *codA* nhằm nâng cao khả năng chịu hạn của cây đậu tương (*Glycine max* (L.) Merrill)”.

2. Mục tiêu nghiên cứu

Biến nạp được cấu trúc mang gen chuyển *codA* vào đậu tương và tạo được cây đậu tương chuyển gen *codA* mã hóa choline oxydase có khả năng chịu hạn cao hơn cây không chuyển gen.

3. Nội dung nghiên cứu

3.1. Nghiên cứu tạo cấu trúc chuyển gen mang gen *codA* trong vector biểu hiện thực vật

- 1) Thiết kế vector biểu hiện gen thực vật chứa cấu trúc mang gen *codA*.
- 2) Biến nạp cấu trúc chuyển gen mang gen *codA* vào mô cây thuốc lá. Đánh giá hoạt động và biểu hiện gen chuyển *codA* trên các dòng thuốc lá chuyển gen.

3.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố đến hiệu quả chuyển gen *codA* ở cây đậu tương

- 1) Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ phosphinothricin (ppt) đến khả năng tạo chồi từ lá mầm đậu tương.
- 2) Phân tích ảnh hưởng của nồng độ khuẩn và thời gian ủ khuẩn, đồng nuôi cấy đến khả năng cảm ứng tạo chồi đậu tương.
- 3) Phân tích ảnh hưởng của nồng độ kháng sinh và thời gian diệt khuẩn đến sự phát sinh và sinh trưởng chồi đậu tương.

3.3. Nghiên cứu biến nạp cấu trúc mang gen *codA* vào giống đậu tương ĐT22 và tạo cây đậu tương chuyển gen chịu hạn

- 1) Biến nạp di truyền và tạo cây đậu tương chuyển gen *codA*.
- 2) Phân tích cây đậu tương chuyển gen *codA*.
- 3) Đánh giá khả năng chịu hạn của một số dòng đậu tương chuyển gen *codA*.

4. Những đóng góp mới của luận án

Luận án là công trình nghiên cứu đầu tiên ở Việt Nam tạo thành công cây đậu tương mang gen *codA* tăng khả năng chịu hạn so với cây đậu tương không mang gen. Luận án là công trình có hệ thống với nội dung được trình bày từ thiết kế vector chuyển gen thực vật, phân tích biểu hiện gen và tạo dòng cây chuyển gen *codA* có hàm lượng GB tích lũy cao.

Cụ thể là:

1) Đã xác định được các yếu tố thích hợp cho chuyển gen *codA* và tạo đa chồi ở giống đậu tương DT22. Nồng độ PPT 3 mg/l ở giai đoạn cảm ứng tạo chồi trong môi trường SIM và nồng độ PPT 1,5 mg/l ở giai đoạn kéo dài chồi trong môi trường SEM; dịch khuẩn có giá trị $OD_{650} = 0,6$, thời gian ủ khuẩn 30 phút, đồng nuôi cấy 5 ngày trong tối và diệt khuẩn bằng cefotaxime 500 mg/l là thích hợp cho cảm ứng tạo chồi và kéo dài chồi trên môi trường chọn lọc.

2) Lần đầu tiên gen *codA* được chuyển thành công và biểu hiện mạnh trong cây đậu tương ở Việt Nam. Sự biểu hiện của gen chuyển *codA* trong cây đậu tương chuyển gen đã làm tăng hàm lượng GB, proline, tăng hoạt độ của POD, giảm hàm lượng MDA so với cây đậu tương không chuyển gen.

3) Bốn dòng đậu tương chuyển gen *codA* ở thế hệ T_1 đã được đánh giá, hàm lượng GB ở dòng đậu tương chuyển gen tăng từ 248,9% - 288,3% so với cây không chuyển gen; hàm lượng proline tăng 1,5- 2 lần, hoạt động của POD tăng gấp 4 lần và hàm lượng MDA giảm 0,5 lần so với cây không chuyển gen.

5. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài luận án

Kết quả nghiên cứu đạt được của luận án có giá trị khoa học và thực tiễn trong tiếp cận nghiên cứu nâng cao khả năng chống chịu các stress phi sinh học của cây đậu tương bằng kỹ thuật chuyển gen.

Về mặt khoa học, kết quả của luận án đã chứng minh được sự tăng cường biểu hiện gen *codA* mã hóa enzyme chia khóa trong con đường sinh tổng hợp GB đã làm tăng khả năng chống chịu hạn ở cây đậu tương. Kết quả nghiên cứu là cơ sở khoa học để cải thiện khả năng chống chịu các yếu tố bất lợi của ngoại cảnh ở thực vật nói chung và cây họ đậu nói riêng bằng kỹ thuật biểu hiện gen. Kết quả đăng tải trên các bài báo khoa học là tài liệu tham khảo có giá trị phục vụ nghiên cứu và giảng dạy sinh học.

Về mặt thực tiễn, các dòng đậu tương chuyển gen *codA* có thể được sử dụng làm vật liệu phục vụ chọn giống đậu tương có khả năng chống chịu hạn. Kết quả nghiên cứu của luận án có thể áp dụng vào các giống cây họ đậu và các loài thực vật khác trong định hướng nghiên cứu nhằm nâng cao hàm lượng GB giúp tăng khả năng chống chịu với các điều kiện bất lợi của môi trường.

6. Cấu trúc của luận án

Luận án có 134 trang (kể cả phụ lục), được chia thành các chương, phần: Mở đầu (5 trang); Chương 1: Tổng quan tài liệu (40 trang); Chương 2: Vật liệu và phương pháp nghiên cứu (16 trang); Chương 3: Kết quả và thảo luận (39 trang); Kết luận và đề nghị (1 trang); Các công trình công bố liên quan đến luận án (1 trang); Tài liệu tham khảo (23 trang); Phụ lục (10 trang). Luận án có 8 bảng, 26 hình, 3 phụ lục và 180 tài liệu tham khảo.

Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

Luận án đã tham khảo và tổng kết 180 tài liệu, trong đó có 11 tài liệu tiếng Việt, 169 tài liệu tiếng Anh về ba vấn đề cơ bản, đó là: (1) Tác động của hạn và cơ chế chịu hạn ở thực vật; (2) GB, choline oxidase; (3) Nâng cao khả năng chịu hạn ở đậu tương bằng kỹ thuật chuyển gen.

Stress hạn gây ảnh hưởng đến hình thái, sinh lý và sự sinh trưởng và gây hậu quả nghiêm trọng ở giai đoạn ra hoa, kết hạt, tạo quả, dẫn tới giảm 73–82% hạt/cây đậu tương. Stress hạn gây rối loạn chức năng của bộ máy quang hợp, giảm diện lục, từ đó giảm hiệu suất của quá trình quang hợp. Stress hạn tăng cường bộ máy chống oxy hóa: loại bỏ các gốc ROS, giảm sự rò rỉ điện giải và peroxy hóa lipid giúp duy trì sức sống, tính toàn vẹn của các bào quan và màng tế bào. Ngoài ra, Stress hạn còn giảm khả năng hấp thụ nguồn khoáng trong đất của rễ, giảm tốc độ vận chuyển chất khoáng ở thân dẫn đến giảm hàm lượng ion trong các mô của cơ thể thực vật. Trong điều kiện hạn, thực vật thường chủ động duy trì cân bằng nước sinh lý bằng các cách sau: (i) Tăng cường phát triển của bộ rễ đồng thời đóng khí khổng để giảm thất thoát nước. (ii) Tăng cường tích lũy các chất tan và điều chỉnh áp suất thẩm thấu trong các mô. (iii) Tăng cường khả năng chống oxy hóa. (iv) Tăng cường điều hòa các hormone.

GB là một dẫn xuất được thay thế hoàn toàn N-metyl của glycine. GB có khối lượng phân tử thấp, là hợp chất amoni bậc bốn, lưỡng cực và trung tính về điện ở pH sinh lý. GB là một hợp chất không độc, không màu, không vị và không mùi, tích tụ trong nhiều loài thực vật. Mức độ tích lũy GB không giống nhau ở các loài khác nhau, các cơ quan khác nhau trong cơ thể thực vật. GB là chất thẩm thấu, chất bảo vệ thẩm thấu hoặc chất hòa tan tương thích. GB được coi là chất kích thích sinh học, sử dụng ở nồng độ thấp để thúc đẩy sự phát triển của cây trồng, tăng khả năng chống chịu stress phi sinh học và nâng cao sản lượng. GB được tổng hợp thông qua nhiều con đường, nhưng phổ biến vẫn là con đường thứ bắt đầu từ choline. Trong đó, ở thực vật gồm 2 bước oxy hoá: (i) choline chuyển thành betaine aldehyde, nhờ xúc tác của choline monooxygenase (CMO), sau đó (ii) betaine aldehyde sẽ chuyển thành GB nhờ xúc tác của betaine aldehyde dehydrogenase (BADH). Ở động vật và nhiều vi khuẩn, bước thứ nhất lại sử dụng choline dehydrogenase (CHDH) trong khi ở bước oxy hoá thứ hai, enzyme vẫn là BADH. Ở vi khuẩn *A. globiformis* và *A. pascens* sử dụng một enzyme duy nhất là choline oxidase (CHO) mã hóa bởi một gen đơn *codA* xúc tác quá trình oxy hóa trực tiếp bốn điện tử của choline thành GB. Từ các con đường sinh tổng hợp GB ở các đối tượng sinh vật khác nhau nhận thấy, con đường sinh tổng hợp GB ở *A. globiformis* và *A. pascens* đơn giản nhất. Từ tiền chất choline chuyển hoá GB chỉ cần một enzyme duy nhất, choline oxidase (COD) mã hóa bởi gen *codA*. Chính vì vậy, gen *codA* mã hoá choline oxidase đã trở thành mục tiêu nghiên cứu ứng dụng công nghệ sinh học cải thiện khả năng chống lại stress thẩm thấu.

Choline oxidase từ *A. globiformis* lần đầu tiên được tinh chế bởi Ikuta năm 1977. Enzyme này là một flavoprotein, xúc tác quá trình oxy hóa bốn electron của choline thành GB với sản phẩm trung gian là betaine aldehyde và chất nhận điện tử cuối cùng là oxy phân tử. Cụ thể bước 1, choline bị oxy hóa thành betaine aldehyde, O_2 bị khử thành hydro peroxide (H_2O_2); bước 2, betaine aldehyde liên kết với enzyme được hydrat hóa tạo ra gem-diol choline, sau đó được oxy hóa thành GB. Gen *codA* mã hoá choline oxidase của vi khuẩn *A. globiformis* (GenBank, mã số AY304485) có kích thước 1641 bp và mã hóa một polypeptit 547 aa, bão hòa bởi hàm lượng G + C, cản trở sự dẫn truyền của

phản ứng chuỗi polymerase do cấu trúc kẹp tóc có khả năng chống nóng chảy. Vì vậy, cần thiết kế mã di truyền, tổng hợp nhân tạo gen *codA* phù hợp với sự biểu hiện gen trong hệ thống tế bào thực vật (với hàm lượng A + T dư thừa). Ngoài ra, bổ sung vào đầu 5' của trình tự gen nhân tạo *codA* một đoạn nucleotide dài 216 bp transit peptide- TP (mã hóa protein vận chuyển tiểu đơn vị Rubisco ở cây thuốc lá) để vận chuyển enzyme vào trong lục lạp. Đầu 3' của gen nhân tạo *codA* được bổ sung một đoạn nucleotide dài 30 bp mã hóa kháng nguyên *cmv* được sử dụng để kiểm tra sự hiện diện của protein *codA* tái tổ hợp ở cây chuyển gen bằng kỹ thuật lai western blot. Như vậy, kích thước của gen *codA* được tổng hợp nhân tạo là 1887 bp (216 bp TP+ 1641 bp *codA*+ 30 bp *cmv*). Chức năng của choline oxidase mã hóa bởi gen *codA* tổng hợp nhân tạo không bị thay đổi so với trình tự gen gốc.

Đậu tương là nguồn cung cấp protein bổ dưỡng với chi phí thấp, được sử dụng làm thức ăn cho con người và gia súc, là loại cây trồng cải tạo đất. Đậu tương có thời gian sinh trưởng ngắn, khả năng thích ứng rộng, có thể bố trí phù hợp với nhiều cơ cấu cây trồng trong sản xuất, nhưng lại thuộc nhóm cây trồng chịu hạn kém. Hạn làm giảm khả năng nảy mầm, sinh trưởng phát triển kém, cây còi cọc, giảm quang hợp, giảm khả năng hút khoáng... Chính vì vậy, nâng cao khả năng chịu hạn ở cây đậu tương để giảm thiểu thiệt hại năng suất trong điều kiện môi trường thiếu nước là nhiệm vụ cấp bách của các nhà chọn giống cây trồng nông nghiệp.

Đậu tương chuyển gen là loại cây trồng biến đổi gen được đưa vào sản xuất đại trà sớm, với diện tích trồng nhiều nhất trên thế giới. Kỹ thuật chuyển gen qua *Agrobacterium* được sử dụng rộng rãi nhất. Trên thế giới và Việt Nam, nhiều công trình nghiên cứu đã thành công trong việc tạo đậu tương chuyển gen cải thiện khả năng chống chịu stress phi sinh học. Nhiều công trình nghiên cứu chuyển gen *codA* mã hóa choline oxidase sinh tổng hợp GB làm tăng khả năng chống chịu của cây trồng trước các điều kiện môi trường bất lợi từ ngoại cảnh. Tuy nhiên, hiện nay chưa có công bố nào về nghiên cứu chuyển gen *codA* ở cây đậu tương. Chính vì vậy, việc chuyển gen *codA* vào đậu tương nhằm nâng cao khả năng chịu hạn là hướng đi mới, có tính thời sự và cấp thiết.

Chương 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. VẬT LIỆU NGHIÊN CỨU

Các vật liệu thực vật: Giống thuốc lá K326 được cung cấp bởi Viện Nghiên cứu thuốc lá. Giống đậu tương ĐT22 được cung cấp bởi Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển đậu đỗ.

Các chủng vi khuẩn và các loại vector: Chủng vi khuẩn *E. coli* DH5α và *A. tumefaciens* C58/pGV2206. Vector *pIBTII*, *pCAMBIA* được thiết kế và sử dụng tại phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam. Trình tự gen *codA* mã hóa cho choline oxidase từ *A. globiformis* khai thác trên Genbank (Mã số AY304485) được tối ưu hóa nhằm tăng tính biểu hiện trên thực vật được cung cấp bởi công ty Epoch Life Science Inc, Mỹ.

Các cặp mồi sử dụng cho phản ứng PCR: *codA-F/R*, *Bar-F/R*, *F/TP-XbaI*, *R/cmyc-SacI*.

2.2. HÓA CHẤT, THIẾT BỊ

Hóa chất: Sử dụng các hoá chất của các hãng Fermentas, Invitrogen, Sigma, Merck, Amersham Pharmacia Biotech...

Thiết bị: Sử dụng thiết bị của Phòng Công nghệ tế bào thực vật và Phòng thí nghiệm trọng điểm Công nghệ gen, Viện Công nghệ Sinh học.

2.3. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.3.1. Nhóm phương pháp thiết kế vector chuyển gen *codA* và chuyển gen ở thuốc lá

Phương pháp thiết kế vector chuyển gen *codA*: Các phản ứng cắt enzyme giới hạn, lai tạo vector tái tổ hợp. Plasmid tái tổ hợp được biến nạp vào tế bào vi khuẩn theo phương pháp xung điện của Cohen và cộng sự (1972).

Chuyển các cấu trúc vector sau thiết kế vào cây thuốc lá và kiểm tra sự có mặt của gen chuyển: theo phương pháp của Topping (1998).

Phân tích hàm lượng GB trong cây thuốc lá chuyển gen: theo phương pháp của Grieve và cộng sự (1983).

2.3.2. Nhóm phương pháp nghiên cứu điều kiện thích hợp cho chuyển gen ở giống đậu tương ĐT22

Khử trùng hạt: Hạt đậu tương được khử trùng bằng khí clore (Cl_2).

Chuẩn bị khuẩn: Các loại môi trường sử dụng trong quá trình nuôi cấy tạo dịch huyền phù vi khuẩn gồm: môi trường nuôi khuẩn đặc, môi trường nuôi khuẩn lỏng và môi trường tạo dịch huyền phù vi khuẩn.

Nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố đến hiệu quả chuyển gen *codA*: Các yếu tố ảnh hưởng được thử nghiệm ở các ngưỡng và nồng độ khác nhau để lựa chọn điều kiện tối ưu cho quy trình chuyển gen.

2.2.3. Nhóm phương pháp tạo cây đậu tương chuyển gen *codA*

Biến nạp di truyền và tạo cây đậu tương chuyển gen: Chuyển gen vào giống ĐT22 theo pháp của Olhoft và cs (2001), có cải tiến. Các dòng đậu tương chuyển gen được sàng lọc bằng chất diệt cỏ PPT.

Phân tích cây đậu tương chuyển gen: DNA tổng số được tách chiết theo phương pháp của Dellaportia (1983). Xác nhận sự hiện diện của gen chuyển *codA* trong các cây bằng kỹ thuật PCR cặp mồi đặc hiệu. Kiểm tra sự hợp nhất của gen chuyển *codA* vào hệ gen cây chuyển gen bằng kỹ thuật Southern blot. Kiểm tra sự biểu hiện của protein tái tổ hợp *codA* bằng kỹ thuật Western blot.

Đánh giá khả năng chịu hạn của một số dòng cây chuyển gen trong điều kiện hạn nhân tạo: Các dòng chuyển gen được đánh giá khả năng chịu hạn trong điều kiện hạn nhân tạo thiết đặt trong buồng sinh trưởng. Đánh giá các chỉ số GB theo phương pháp của Grieve và cộng sự (1983); chỉ số MDA, proline và hoạt độ POD theo phương pháp của Chen và Zhang (2016).

2.3.4. Phân tích và xử lý dữ liệu: Số liệu được xử lý bằng phần mềm SPSS.

2.3. ĐỊA ĐIỂM NGHIÊN CỨU

Thí nghiệm được thực hiện tại Viện Công nghệ sinh học trong thời gian từ 2017- 2020. Luận án được hoàn thành tại Bộ môn Di truyền học và Công nghệ sinh học, Khoa Sinh học Trường Đại học Sư phạm, ĐH Thái Nguyên.

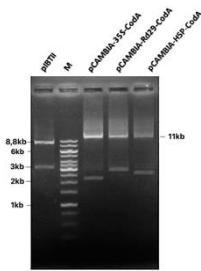
Chương 3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. THIẾT KẾ VÀ BIỂU HIỆN VECTOR CHUYỂN GEN MANG GEN *codA*

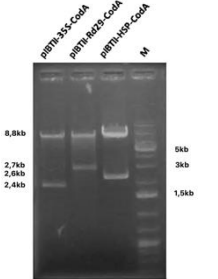
3.1.1. Tạo cấu trúc chuyển gen *codA*

Ba vector biểu hiện gen thực vật *pBTII* mang promoter *35S*, *rd29A* và *HSP* tương ứng để điều khiển biểu hiện gen *codA* ở cây đậu tương đã được thiết kế. Sau khi tiến hành tách chiết và tinh sạch, các vector *pIBTII* và *pCAMBIA-HSP*-

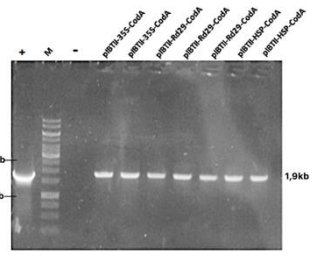
codA, *pCAMBIA-35S-codA*, *pCAMBIA-rd29A-codA* được cắt bằng hai enzyme *hindIII* và *EcoRI*. Cấu trúc và kích thước của vector *pIBTII* và vector *pCAMBIA* mang gen chuyển *codA* trong hình 3.1 cho thấy, các plasmid đã bị cắt hoàn toàn thành hai băng đúng với kích thước lý thuyết. Vector *pIBTII* bị cắt thành hai băng 8,8 kb và 3 kb; các vector *pCAMBIA-35S-codA*, *pCAMBIA-rd29A-codA*, *pCAMBIA-HSP-codA* bị cắt thành các băng có kích thước khoảng 11 kb và 2,4 kb, 2,7 kb và 2,6 kb tương ứng với kích thước của *pCAMBIA* và cấu trúc mang gen chuyển *35S-codA*, *Rd29A-codA*, *HSP-codA*.



Hình 3.1. Ảnh điện di sản phẩm cắt vector *pIBTII* và *pCAMBIA* bằng enzyme *HindIII* và *EcoRI*



Hình 3.3. Ảnh điện di sản phẩm cắt kiểm tra plasmid *pIBTII* mang các cấu trúc gen thiết kế



Hình 3.4. Ảnh điện di sản phẩm PCR kiểm tra khuẩn *A.tumefaciens* C58 mang các cấu trúc gen thiết kế

Phân đoạn của vector chuyển gen *pIBTII* và phân đoạn của cấu trúc mang gen chuyển *35S-codA*, *rd29A-codA*, *HSP-codA* được ghép nối với nhau bằng phản ứng T4 ligase. Sản phẩm ligase được biến nạp vào tế bào vi khuẩn khả biến *E. coli* DH5 α bằng sốc nhiệt. Kiểm tra colony-PCR với cặp mồi đặc hiệu *codA-F/codA-R* để lựa chọn dòng *E. coli* DH5 α mang vector chuyển gen *codA*. Kết quả điện di cho thấy, 7 dòng khuẩn lạc được kiểm tra đều dương tính với colony-PCR, băng điện di thu được có kích thước 1,9 kb tương ứng với kích thước của vector chuyển gen *codA* đã tính toán. Như vậy, vector chuyển gen *codA* đã tồn tại trong tế bào vi khuẩn *E. coli*.

Để xác thực thêm độ chính xác của vector mới thiết kế, lấy ngẫu nhiên ba dòng khuẩn lạc dương tính chứa vector *pIBTII-HSP-codA*, *pIBTII-35S-codA*, *pIBTII-rd29A-codA* tương ứng nuôi lỏng và tách plasmid. Plasmid được cắt với enzyme *HindIII* và *EcoRI*. Sản phẩm cắt được điện di và chụp ảnh thể hiện trong hình 3.3 cho thấy, xuất hiện hai băng gần với băng 8,8 kb của *pIBTII* và 2,4 kb,

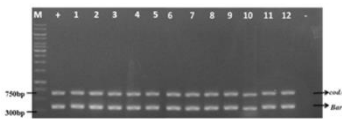
2,7 kb và 2,6 kb của *pCAMBIA-35S-codA*, *pCAMBIA-rd29A-codA*, *pCAMBIA-HSP-codA* chứng tỏ các dòng khuẩn lạc được kiểm tra đều mang vector cần thiết kể. Toàn bộ 7 dòng khuẩn lạc dương tính này được nuôi trong môi trường LB lỏng bổ sung kháng sinh chọn lọc (spectinomycin) để nhân dòng vector tái tổ hợp cho biến nạp vào *A. tumefaciens* phục vụ chuyển gen.

3.1.2. Đánh giá hoạt động của vector mang gen chuyển *codA* trên cây thuốc lá

3.1.2.1. Tạo cây thuốc lá chuyển gen thông qua *A. tumefaciens*

Nhằm mục đích kiểm tra hoạt động của vector chuyển gen *codA*, chúng tôi tiến hành chuyển các cấu trúc mang gen *codA* vào cây mô hình thuốc lá giống K326 và đánh giá hiệu quả chọn lọc của gen Bar. Kết quả thí nghiệm biến nạp cho thấy, tỷ lệ số chồi tái sinh sau khi chuyển gen và chọn lọc cao ở cả ba cấu trúc *pIBTII-HSP-codA*, *pIBTII-35S-codA*, *pIBTII-rd29A-codA* đạt 88%, 90%, 92% tương ứng và các chồi của 3 cấu trúc có tỷ lệ sống sót trên môi trường tạo rễ có bổ sung phosphinothricin từ 42,64- 54,23%. Ngược lại, các mảnh lá đối chứng có tỷ lệ phát sinh chồi chỉ đạt 27%, các chồi nhỏ và chết vàng sau 2 tuần biến nạp. Các dòng thuốc lá chuyển gen sống sót sau chọn lọc bằng phosphinothricin được ra cây bằng giá thể TN1 trong điều kiện nhà lưới. Sau 30 ngày, lá non được thu mẫu, tách chiết DNA tổng số và kiểm tra sự có mặt của gen chuyển *codA* bằng phương pháp PCR với 2 cặp mồi *codA* F/R và bar F/R, kết quả được thể hiện ở hình 3.5.

Kết quả phân tích hình 3.5 cho thấy, băng điện di có kích thước khoảng 750 bp và 400 bp phù hợp với kích thước của đoạn gen *codA* và gen *bar*.



Hình 3.5. Hình ảnh kết quả điện di sản phẩm PCR các dòng thuốc lá chuyển gen

M: marker 1 kb, giếng +: đối chứng dương, giếng 1 -5: các dòng chuyển gen cấu trúc *rd29A-codA*, giếng 6 - 9: các dòng chuyển gen cấu trúc *35S-codA*, giếng 10-12: các dòng chuyển gen cấu trúc *HSP-codA*, giếng -: đối chứng âm.



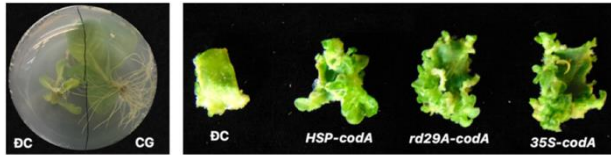
Hình 3.6. Chồi thuốc lá chuyển gen chọn lọc trên môi trường bổ sung PPT 1,5 mg/l

3.1.2.2. Kết quả đánh giá và phân tích các dòng thuốc lá chuyển gen

Chúng tôi tiếp tục gây hạn nhân tạo *in vitro* đối với các dòng thuốc lá chuyển gen bằng PEG 8000 2,5%. Kết quả cho thấy, các cây thuốc lá chuyển gen

ở trong môi trường hạn nhân tạo có khả năng duy trì áp suất thẩm thấu, phát triển mạnh bộ rễ để tăng cường sức chống chịu, các cây đối chứng trong môi trường hạn nhân tạo bị mất cân bằng áp suất thẩm thấu dẫn đến còi cọc và chết.

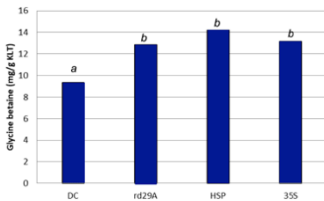
Chúng tôi tiến hành thí nghiệm gây hạn nhân tạo cho các dòng cây chuyển gen trong nhà lưới, thí nghiệm được thực hiện trong buồng sinh trưởng ở 37°C, độ ẩm 55% và hoàn toàn không tưới nước trong suốt thời gian thí nghiệm. Kết quả đánh giá kiểu hình sau 7 ngày thí nghiệm cho thấy, các dòng thuốc lá chuyển gen vẫn sinh trưởng tốt trong khi các cây đối chứng héo sau ngày thứ 3 gây hạn và chết hoàn toàn sau 7 ngày gây hạn. Sự tích lũy GB dưới điều kiện hạn cũng được đánh giá vào ngày thứ 7 của thí nghiệm.



Hình 3.7. Kết quả gây hạn sinh lý bằng PEG 8000 2,5% các dòng thuốc lá chuyển gen

A) chồi tạo rễ trên môi trường hạn sinh lý;

B) các mảnh lá tạo chồi trên môi trường hạn sinh lý



Hình 3.8. Kết quả định lượng hàm lượng GB trong thuốc lá chuyển gen

Các chữ cái khác nhau trên mỗi cột biểu thị khác biệt ở $P < 0,05$

Kết quả định lượng GB tích lũy trong điều kiện hạn ở hình 3.8 cho thấy, cây chuyển gen có khả năng chịu hạn tốt hơn so với cây đối chứng cụ thể lượng GB tích lũy trung bình của các cây chuyển gen dòng *rd29A-codA*, *HSP-codA*, *35S-codA* lần lượt là 12,43 mg/g khối lượng khô (mg/g KLT), 13,89 mg/g KLT, 12,89 mg/g KLT, so với hàm lượng GB tích lũy của cây đối chứng là 9,88 mg/g KLT. Như vậy, trong điều kiện hạn, sự biểu hiện của gen *codA* đã cải thiện khả năng chịu hạn của cây chuyển gen so với cây đối chứng nhờ việc tích lũy một lượng lớn GB. Như vậy, từ kết quả phân tích trên cây thuốc lá có thể kết luận, ba vector chuyển gen *pIBTII-HSP-codA*, *pIBTII-35S-codA*, *pIBTII-rd29A-codA*

thiết kế đều hoạt động tốt trong cây thuốc lá chuyển gen và có thể sử dụng làm vật liệu để chuyển gen vào cây đậu tương cũng như các cây trồng khác.

3.1.3. Thảo luận kết quả thiết kế vector và hoạt động của vector biểu hiện trên cây thuốc lá

Promoter là yếu tố đóng vai trò quan trọng trong việc kiểm soát quá trình biểu hiện của gen. Trong nghiên cứu của chúng tôi, promoter 35S, *HSP*, *rd29A* được lựa chọn và là thành phần của cấu trúc mang gen chuyển 35S-*codA*, *rd29A-codA*, *HSP-codA* trong vector chuyển gen *pIBTII*. Trong điều kiện không hạn, sự hoạt động mạnh của ba loại vector này sẽ giúp gen chuyển *codA* khởi động phiên mã tổng hợp choline oxidase, enzyme chìa khoá xúc tác cho quá trình sinh tổng hợp GB từ choline trong cây đậu tương chuyển gen giúp điều chỉnh áp suất thẩm thấu nội bào, giảm stress oxy hoá, từ đó tăng cường khả năng chống chịu hạn ở cây đậu tương chuyển gen *codA*.

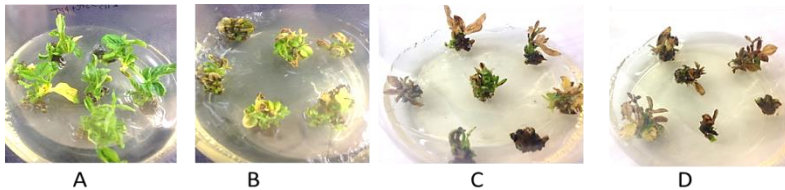
Một quy trình biến nạp gen hiệu quả không thể thiếu sự lựa chọn tác nhân chọn lọc hiệu quả để phân biệt giữa tế bào chuyển gen và không chuyển gen. Gen chỉ thị chọn lọc *bar* có khả năng kháng thuốc diệt cỏ PPT. Gen *bar* đã được sử dụng rộng rãi và là chỉ thị lý tưởng để xác định các mô chuyển gen và cả trong điều kiện nhà kính hoặc đồng ruộng đã được chúng tôi sử dụng trong vector chuyển gen *codA*. Ngoài ra, để phát hiện và định lượng protein tái tổ hợp trong cây đậu tương chuyển gen bằng kỹ thuật Western blot, cấu trúc mang gen chuyển *codA* còn được gắn thêm đoạn DNA mã hóa kháng nguyên cmyc- một lựa chọn phổ biến, kinh tế và hiệu quả của nhiều nghiên cứu hiện nay.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, thuốc lá được sử dụng làm cây mô hình để đánh giá hoạt động của vector biểu hiện mang gen chuyển *codA* trước khi chuyển vào cây đậu tương nhằm nâng cao khả năng chịu hạn. Kết quả biểu hiện gen *codA* ở cây thuốc lá đạt hiệu suất chuyển gen 42,64- 54,23% là cơ sở vững chắc để chúng tôi tiếp tục thực hiện biểu hiện gen *codA* vào cây đậu tương và các cây trồng khác.

3.2. ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ YẾU TỐ ĐẾN HIỆU QUẢ CHUYỂN GEN *codA* Ở GIỐNG ĐẬU TƯƠNG ĐT22

3.2.1. Ảnh hưởng của nồng độ PPT đến khả năng tạo chồi đậu tương

Để xác định hàm lượng ppt sử dụng chọn lọc các chồi chuyển gen thí nghiệm, các cụm chồi chuyển sang môi trường SIM2, bổ sung ppt với 5 nồng độ (0; 1; 3; 5; 7) mg/l. Theo dõi sau hai tuần, nhận thấy, sau 14 ngày nuôi cấy trên môi trường SIM2 có chứa PPT 0 mg/l và 1 mg/l, các cụm chồi xanh và phát triển bình thường, trong khi đó, lá của các cụm chồi úa vàng và rụng ở ngày thứ 7 trên môi trường SIM2 có chứa PPT 3-5 mg/l. Trên môi trường SIM2 có chứa ppt 7 mg/l, các cụm chồi chết khô hoàn toàn sau 8 ngày nuôi cấy và tỉ lệ chồi kéo dài giảm theo sự tăng nồng độ của ppt. Sau khoảng 30 ngày, cụm chồi trên các môi trường bổ sung nồng độ PPT 3 mg/l sinh trưởng phát triển chậm, nhưng có hiện tượng tạo cụm chồi mới và xanh. Ở nồng độ PPT 5 mg/l, chồi chết hoàn toàn. Từ các kết quả phân tích trên, chúng tôi quyết định lựa chọn môi trường SIM bổ sung PPT 3,0 mg/l để chọn lọc cây đậu tương chuyển gen.



Hình 3.9. Các mảnh lá mầm trên môi trường chọn lọc SIM2 với nồng độ PPT khác nhau sau 14 ngày nuôi cấy

A: 1 mg/l; B: 3 mg/l; C: 5 mg/l; D: 7 mg/l

3.2.2. Ảnh hưởng của nồng độ khuẩn và thời gian ủ khuẩn, đồng nuôi cấy đến khả năng cảm ứng tạo chồi đậu tương

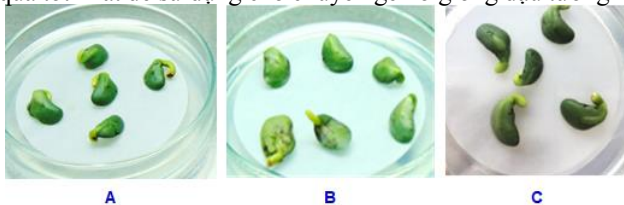
3.2.2.1. Ảnh hưởng của nồng độ khuẩn đến khả năng cảm ứng tạo chồi đậu tương

Để xác định nồng độ khuẩn *Agrobacterium* ở OD₆₅₀ sử dụng cho chuyển gen vào đậu tương, chúng tôi tiến hành lây nhiễm các mảnh lá mầm hạt đậu tương đã được làm tổn thương tại nách lá mầm với dịch khuẩn có giá trị OD₆₅₀ khác nhau, lần lượt là 0,4; 0,6; 0,8 và 1,0 trong vòng 30 phút, sau đó tiến hành đồng nuôi cấy các mảnh lá mầm đã lây nhiễm trên môi trường CCM trong 5 ngày. Sau 14 ngày, mảnh lá mầm tiếp tục được chuyển sang môi trường SEM có chứa PPT 1,5 mg/l. Kết quả ở bảng 3.3 cho thấy, sau 14 ngày nuôi cấy trên môi trường SIM1 không chứa PPT, không thấy sự sai khác nhiều về khả năng tạo

chồi của mảnh lá mầm khi được lây nhiễm với dịch khuẩn có giá trị OD_{650} là 0,4 và 0,6. Đối với các mảnh lá mầm được lây nhiễm với dịch khuẩn có giá trị OD_{650} là 0,8 và 1,0, tỷ lệ tái nhiễm khuẩn của các mảnh lá mầm rất cao, các mảnh lá mầm thường chết và không tạo đa chồi. Các mảnh lá mầm được lây nhiễm với dịch khuẩn có giá trị OD_{650} là 0,4 và 0,6 tiếp tục được chọn lọc trên môi trường SIM2 và SEM có bổ sung PPT. Sau 14 ngày nuôi cấy chọn lọc, các mảnh lá mầm được lây nhiễm với dịch khuẩn có giá trị OD_{650} 0,6 vẫn tiếp tục sinh trưởng và phát sinh chồi, trong khi các mảnh lá mầm được lây nhiễm với dịch khuẩn có giá trị OD_{650} 0,4 gần như chết hoàn toàn trên môi trường chọn lọc. Vì vậy, chúng tôi lựa chọn dịch khuẩn có giá trị OD_{650} đạt 0,6 để sử dụng cho biến nạp.

3.2.2.2. Ảnh hưởng của thời gian ủ khuẩn *A. tumefaciens* và đồng nuôi cấy đến khả năng cảm ứng tạo chồi đậu tương

Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian ủ khuẩn *Agrobacterium* và đồng nuôi cấy đến hiệu quả chuyển gen ở giống đậu tương ĐT22 được thực hiện với các khoảng thời gian ủ lần lượt là: 15 phút; 30 phút; 45 phút; thời gian đồng nuôi cấy 2 ngày, 5 ngày và 8 ngày, kết quả được trình bày ở bảng 3.4 cho thấy, với thời gian lây nhiễm 15 phút, các cụm mầm bị chết gần như hoàn toàn ở giai đoạn cuối của chọn lọc lần 1; thời gian lây nhiễm 45 phút, tỷ lệ nhiễm lại khuẩn rất cao và loại bỏ nhiều ở giai đoạn cảm ứng tạo chồi SIM1. Ở thời gian đồng nuôi cấy 2 ngày, các mảnh lá mầm nhỏ hơn nhiều so với đồng nuôi cấy 5 ngày và 8 ngày, nhưng với thời gian đồng nuôi cấy 8 ngày khuẩn mọc lại rất cao đến ngày thứ 6 của đồng nuôi cấy khuẩn mọc lan ra ngoài của giấy lọc và đến ngày thứ 8 một số mảnh bị thối (Hình 3.10). Vì vậy, thời gian lây nhiễm 30 phút và đồng nuôi cấy 5 ngày cho kết quả tốt nhất để sử dụng cho chuyển gen ở giống đậu tương ĐT22.



Hình 3.10. Các mảnh lá mầm sau các thời gian đồng nuôi cấy khác nhau
A: 2 ngày; B: 5 ngày; C: 8 ngày

3.2.3. Ảnh hưởng của nồng độ kháng sinh và thời gian diệt khuẩn đến sự phát sinh và sinh trưởng chồi đậu tương

Xác định kháng sinh và thời gian rửa khuẩn sau 5 ngày đồng nuôi cấy là yếu tố quan trọng đến khả năng diệt khuẩn và tạo đa chồi của các mảnh lá mầm sau khi được lây nhiễm *A. tumefaciens* tái tổ hợp. Sử dụng kháng sinh diệt khuẩn phổ rộng cefotaxime với nồng độ lần lượt là 200 mg/l, 500 mg/l và 1000 mg/l bổ sung vào môi trường rửa khuẩn (SIM lỏng) với thời gian rửa 5 phút, 10 phút, và 15 phút. Kết quả qua từng giai đoạn cho thấy, nồng độ cefotaxime 500 mg/l được bổ sung vào môi trường diệt khuẩn rửa trong thời gian 10 phút cho kết quả tốt nhất. Ở nồng độ cefotaxime 1000 mg/l, các mảnh lá mầm tạo đa chồi kém, tại vị trí nách lá mầm sau khi tạo tổn thương bị đen và không tạo được cụm đa chồi. Ở nồng độ cefotaxime 200 mg/l, các mảnh lá mầm bị tái nhiễm khuẩn rất cao, chỉ sau tuần đầu cảm ứng tạo chồi, hầu hết các mảnh đều bị nhiễm lại khuẩn (Bảng 3.5).

3.2.4. Thảo luận kết quả nghiên cứu ảnh hưởng của một số yếu tố đến hiệu quả chuyển gen *codA* ở giống đậu tương ĐT22

Hiện nay, nhiều quy trình chuyển gen đã được áp dụng đối với cây đậu tương, nhưng phổ biến là biến nạp gen bằng lây nhiễm *A. tumefaciens* tái tổ hợp qua nách lá mầm. Tuy nhiên, phương pháp này vẫn còn một số hạn chế cần được khắc phục... và hiệu quả chuyển gen còn phụ thuộc vào kiểu gen của từng giống đậu tương. Chính vì vậy nghiên cứu chọn điều kiện chuyển gen thích hợp với kiểu gen của mỗi giống được chú ý và quan tâm bởi các nhà nghiên cứu chuyển gen ở đậu tương. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi đã chỉ ra những ảnh hưởng một số yếu tố ảnh hưởng đến hiệu quả chuyển gen *codA* vào giống đậu tương ĐT22 của Việt Nam đã được khảo sát và đánh giá, bao gồm nồng độ phosphinothricin, nồng độ khuẩn, thời gian ủ khuẩn *A. tumefaciens*, đồng nuôi cấy, nồng độ kháng sinh chọn lọc và thời gian diệt khuẩn. Lựa chọn tác nhân chọn lọc hiệu quả là một bước quan trọng trong một quy trình biến nạp gen. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, sử dụng PPT 3 mg/l ở giai đoạn cảm ứng tạo chồi trong môi trường SIM và PPT 1,5 mg/l ở giai đoạn kéo dài chồi trong môi trường SEM cho hiệu quả chọn lọc cao nhất. Bên cạnh đó, nồng độ khuẩn khi lây nhiễm, ủ khuẩn *Agrobacterium* và đồng nuôi cấy là yếu tố ảnh hưởng rất

lớn đến hiệu quả chuyển gen thông qua *A. tumefaciens*. Trong kết quả nghiên cứu của chúng tôi, các mảnh lá mầm đậu tương đã được làm tổn thương tại nách lá mầm được lây nhiễm với dịch khuẩn có giá trị OD₆₅₀ khác nhau, dịch khuẩn có giá trị OD₆₅₀ = 0,6 với thời gian ủ khuẩn 30 phút, đồng nuôi cấy 5 ngày trong tối là thích hợp cho cảm ứng tạo chồi và kéo dài chồi trên môi trường chọn lọc. Ngoài ra, việc xác định kháng sinh và thời gian rửa khuẩn sau 5 ngày đồng nuôi cấy là yếu tố quan trọng đến khả năng diệt khuẩn và tạo đa chồi của các mảnh lá mầm sau khi được lây nhiễm *A. tumefaciens* tái tổ hợp. Kết quả qua từng giai đoạn cho thấy, nồng độ cefotaxime 500 mg/l được bổ sung vào môi trường diệt khuẩn rửa trong thời gian 10 phút cho kết quả tốt nhất để sử dụng cho chuyển gen ở giống đậu tương ĐT22.

Như vậy, từ kết quả đánh giá các tác động của các yếu tố lên khả năng biến nạp và tạo đa chồi ở giống đậu tương ĐT22, chúng tôi đã được xác định các yếu tố thích hợp cho chuyển gen *codA* và tạo đa chồi ở giống đậu tương ĐT22. Kết quả này là tiền đề để chúng tôi hoàn thiện quy trình chuyển gen *codA* vào giống đậu tương ĐT22 nhằm phục vụ cho các nghiên cứu tiếp theo của đề tài.

3.3.1. Kết quả chuyển gen *codA* vào giống đậu tương ĐT22

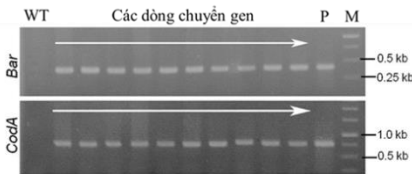
Kết quả biến nạp vector chuyển gen vào mảnh lá mầm đậu tương trong bảng 3.6. cho thấy, số lượng mẫu biến nạp cho mỗi cấu trúc khoảng 3000 mẫu, trong đó số mẫu tạo đa chồi đạt tỉ lệ từ 62,75% đến 73,55%. Từ các cụm chồi này, sau 3 giai đoạn kéo dài chồi thu được lần lượt 128, 138, 140 chồi kéo dài tương ứng lần lượt với cấu trúc *HSP-codA*, *35S-codA*, và *rd29A-codA*. Các chồi đạt chiều cao 2,5–3,5 cm và có các lá chính được cắt sang môi trường tạo rễ. Các chồi ra rễ tạo cây hoàn chỉnh được trồng trên giá thể TN1 bổ sung 25% tribat. Sau quá trình thích nghi sinh trưởng trong buồng sinh trưởng nhiệt độ 28°C, độ ẩm 80%, quang chu kỳ sáng/tối là 16/8, thu được tổng số 60 cây đậu tương của ba cấu trúc chuyển gen sinh trưởng và phát triển tốt.

3.3.2. Phân tích cây đậu tương chuyển gen

3.3.2.1. Sàng lọc cây chuyển gen bằng chất diệt cỏ và PCR

Các dòng đậu tương T₀ phết trực tiếp PPT 250mg/l trên bề mặt lá. Sau 3 ngày phết chất diệt cỏ, phần lá tại vị trí phết của cây đối chứng và một số dòng chuyển gen co lại, mất dần sắc tố xanh lục của lá và chuyển vàng; sau 5 ngày

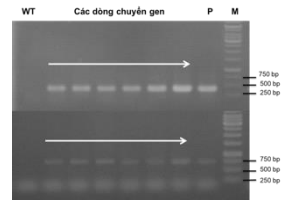
phết, vị trí lá thử chất diệt cỏ chuyển sang vàng nâu, cháy khô. Bên cạnh đó, một số dòng chuyển gen không xuất hiện dấu hiệu gây hại của chất diệt cỏ tại vị trí thử, lá không bị mất màu màu sắc. Như vậy từ 60 dòng T_0 thu được sau khi sàng lọc bằng chất diệt cỏ, thu được 29 dòng đậu tương chuyển gen thế hệ T_0 không mất cảm với ppt 250mg/l. Các dòng T_0 được kiểm tra bằng phản ứng PCR với 2 cặp mồi *codA* F/R và *Bar* F/R. Kết quả PCR thu được 27 dòng cho kết quả dương tính trong đó có 8 dòng HSP-*codA*, 10 dòng 35S-*codA* và 9 dòng *rd29A*-*codA* (hình 3.14).



Hình 3.14. Kết quả kiểm tra cây T_0 bằng PCR

M: thang DNA chuẩn 1kb; P: khuẩn *A. tumefaciens* mang vector tái tổ hợp;

WT: mẫu lá đậu tương DT22



Hình 3.15. Kết quả kiểm tra cây T_1 bằng PCR

M: thang DNA chuẩn 1kb; P: khuẩn *A. tumefaciens* mang vector tái tổ hợp;

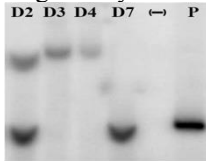
WT: mẫu lá đậu tương DT22

Từ 27 dòng T_0 thu hạt đem gieo sang thế hệ T_1 , tiến hành sàng lọc và kiểm tra bằng PPT 250mg/l, thu được 8 dòng không mất cảm ppt gồm có 6 dòng *rd29A*-*codA* và 2 dòng HSP-*codA*. 8 dòng này được PCR với 2 cặp mồi đặc hiệu thu được 4 dòng *rd29A*-*codA* (D2, D3, D4, D7) và 2 dòng HSP-*codA* (H3, H11) nhận được 2 băng có kích thước khoảng 750bp và 400bp phù hợp với kích thước của đoạn gen *codA* và gen *bar* tương ứng được thể hiện trong hình 3.15.

Kết quả trên cho thấy, lượng dòng chuyển gen giảm ở thế hệ T_1 do lượng hạt thu từ cây *in vitro* T_0 ít, chất lượng hạt không đồng đều ảnh hưởng đến sức nảy mầm của hạt ở thế hệ tiếp theo. Như vậy, chúng tôi đã thu được các dòng 27 dòng đậu tương mang gen *codA* ở thế hệ T_0 và 6 dòng ở thế hệ T_1 , hiệu suất chuyển gen đạt khoảng 0,33% ở thế hệ T_0 . Để kiểm tra các dòng đậu tương chuyển gen ở các thế hệ tiếp theo chúng tôi sử dụng 4 dòng T_1 (D2, D3, D4, D7) mang promoter cảm ứng chịu hạn *rd29A* do sự biểu hiện hoạt động tích cực của promoter này, 2 dòng T_1 (H3, H11) mang gen *codA* dưới sự hoạt động của promoter cảm ứng nhiệt *HSP* được thu hạt và bảo quản cùng silica gel.

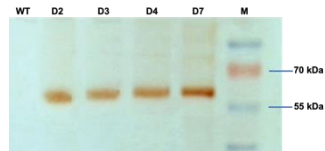
3.3.2.2. Kiểm tra sự hợp nhất và sự biểu hiện của gen chuyển *codA* trong các dòng đậu tương chuyển gen bằng kỹ thuật Southern blot và Western blot

Bốn dòng đậu tương chuyển gen cấu trúc *rd29A-codA* thế hệ T_1 được kiểm tra bằng kỹ thuật Southern blot để chứng minh sự hợp nhất của gen chuyển *codA* vào hệ gen cây đậu tương biop và xác định số bản copy của gen chuyển. Kết quả phân tích Southern blot trong hình 3.16 cho thấy, các băng lai DNA xuất hiện ở cả bốn dòng đậu tương chuyển gen được kiểm tra. Các dòng D3, D4 và D7 có một băng lai xuất hiện; còn dòng D2 xuất hiện 2 băng lai. Điều này chỉ ra rằng gen *codA* có 1 bản copy trong các dòng D3, D4 và D7, và có 2 bản copy trong dòng D2. Băng lai của hai dòng D3 và D4 cho thấy có thể hai dòng này được tạo ra từ cùng một lô chuyển gen. Kết quả phân tích này đã chứng minh sự hợp nhất của gen chuyển *codA* vào hệ gen cây đậu tương chuyển gen.



Hình 3.16. Kết quả phân tích Southern blot các dòng đậu tương chuyển gen thế hệ T_1

D2-D7: các dòng đậu tương chuyển gen cấu trúc *rd29A-codA* thế hệ T_1 ; (-): đối chứng âm; P: Plasmid pIBTII-35S-*codA* làm đối chứng dương



Hình 3.17. Kết quả phân tích Western blot các dòng đậu tương chuyển gen thế hệ T_1

D2-D7: các dòng đậu tương chuyển gen cấu trúc *rd29A-codA* thế hệ T_1 ; M: Marker; WT: mẫu đậu tương không chuyển gen

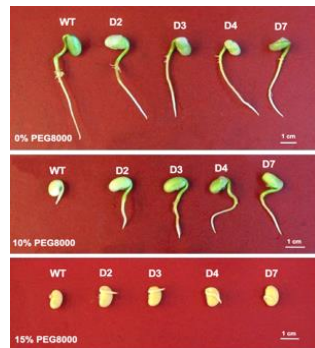
Tiếp tục phân tích sự biểu hiện của gen chuyển *codA* trên 4 dòng chuyển gen thế hệ T_1 (D2, D3, D4, D7) thông qua xác định sự có mặt của protein tái tổ hợp bằng Western blot. Protein tái tổ hợp của cấu trúc chuyển gen *codA* có chứa kháng nguyên cmcy ở đầu C, do đó protein tái tổ hợp này có thể được phát hiện bằng kỹ thuật Western blot. Tiến hành kỹ thuật Western blot với mẫu lá non của các dòng đậu tương chuyển gen cấu trúc *rd29A-codA* thế hệ T_1 để đánh giá sự biểu hiện của gen chuyển trong cây, kết quả được thể hiện trên hình 3.17. Kết quả phân tích Western blot cho thấy, các băng protein có kích thước ~60 kDa tương đương với khối lượng phân tử choline oxidase được mã hóa bởi gen *codA* khi tra cứu trên ngân hàng NCBI. Trên hình 3.17, các cây chuyển gen đều cho băng vạch sáng rõ, trong khi cây WT không có băng vạch tương đương. Kết quả phân tích biểu hiện

protein choline oxidase tái tổ hợp ở cây đậu tương chuyển gen *codA* đã chứng minh gen chuyển mang cấu trúc *rd29A-codA* và *HSP-codA* đã di truyền từ thế hệ T_0 sang thế hệ T_1 và được biểu hiện thành protein tái tổ hợp choline oxidase.

3.3.3. Thử nghiệm đánh giá khả năng chịu hạn của một số dòng đậu tương chuyển gen

3.3.3.1. Đánh giá sức nảy mầm của hạt dưới điều kiện hạn nhân tạo

Giai đoạn hạt nảy mầm và thân mầm là các giai đoạn quan trọng đối với sự tăng trưởng và phát triển của thực vật đặc biệt nhạy cảm với các điều kiện thiếu nước. Vì thế, hạt của các dòng đậu tương chuyển gen ở thế hệ T_1 đã được đánh giá trong điều kiện khô hạn nhân tạo bằng cách bổ sung 10% hoặc 15% PEG 8000 vào môi trường dinh dưỡng. Sau 5 ngày nuôi cấy trên môi trường không bổ sung PEG 8000 (0% PEG 8000), không nhận thấy sự khác biệt trong chiều dài thân mầm giữa dòng ĐT22 và các dòng chuyển gen thể hiện trong hình 3.18. cho thấy, tất cả các hạt của các dòng thí nghiệm đều nảy mầm tốt và có chiều dài thân mầm đạt xấp xỉ 5 cm ở môi trường GM không chứa PEG 8000. Ngược lại, trên môi trường có bổ sung 10% PEG8000, các hạt của dòng chuyển gen và ĐT22 đều nảy mầm, tuy nhiên chiều dài của thân mầm của các dòng đậu tương là khác nhau. Dòng ĐT22 không chuyển gen biểu hiện giảm chiều dài thân mầm còn dưới 4 cm, ngắn hơn hẳn so với các dòng chuyển gen, trong khi hạt của các dòng chuyển gen vẫn duy trì sự sinh trưởng bình thường. Trên môi trường chứa 15% PEG 8000, khả năng nảy mầm và sinh trưởng của cả dòng ĐT22 và dòng chuyển gen đều giảm đi đáng kể. Khả năng sinh trưởng của hạt trên môi trường bị ức chế. Tuy nhiên, các hạt của dòng chuyển gen vẫn có tỷ lệ sinh trưởng cao hơn và có chiều dài thân mầm lớn hơn hẳn so với dòng ĐT22 thể hiện trong đồ thị hình 3.19. Như vậy, nhờ biểu hiện của gen *codA*, các hạt đậu tương có khả năng nảy



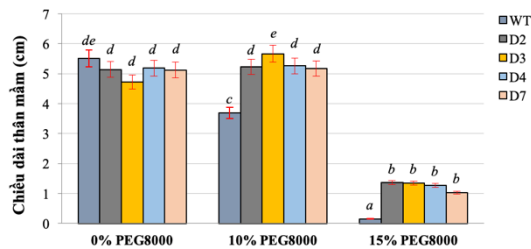
Hình 3.18. Khả năng nảy mầm của đậu tương sau 5 ngày nuôi cấy trên môi trường hạn nhân tạo

D2-D7: các dòng đậu tương chuyển gen thế hệ T_1 , WT: dòng đậu tương ĐT22 không chuyển gen

mầm và sinh trưởng tốt hơn so với dòng không chuyển gen (ĐT22) trong điều kiện hạn nhân tạo in vitro.

3.3.3.2. Đánh giá khả năng sinh trưởng và chịu hạn của cây đậu tương chuyển gen dưới điều kiện hạn nhân tạo

Để đánh giá sinh trưởng và phát triển của đậu tương trong môi trường hạn nhân tạo, hạt của các dòng đậu tương chuyển gen *codA* và đậu tương ĐT22 không chuyển gen được trồng riêng lẻ trong một chậu và được kiểm tra bằng phết chất diệt cỏ. Ở giai đoạn 2 của thí nghiệm, cây đậu tương được xử lý gây hạn nhân tạo trong buồng tăng trưởng. Trong suốt quá trình thí nghiệm, các cây đậu tương chuyển gen và ĐT22 được đặt trong điều kiện đối chứng đều sinh trưởng và phát triển bình thường ở điều kiện tưới đủ nước, không nhận thấy sự khác biệt về hình thái thực vật giữa các dòng.



Hình 3.19. Chiều dài thân mầm của các dòng hạt đậu tương trên môi trường hạn nhân tạo D2-D7: các dòng đậu tương chuyển gen thế hệ T_1 , WT: dòng ĐT22 không chuyển gen. Các chữ cái khác nhau trên mỗi cột biểu thị khác biệt ở $P < 0,05$

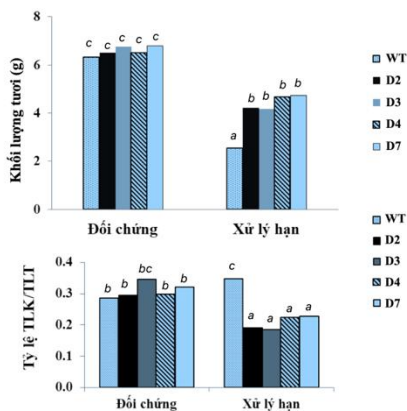
Ngược lại, trong điều kiện hạn nhân tạo, tốc độ sinh trưởng của dòng đậu tương ĐT22 có dấu hiệu chậm lại so với các dòng đậu tương chuyển gen. Hơn nữa, đến ngày thí nghiệm thứ 9, trong điều kiện hạn, các lá của dòng đậu tương ĐT22 cho thấy sinh trưởng có dấu hiệu bị úa vàng, khô lại và héo rụng. Trong khi đó, các lá đậu tương của các dòng chuyển gen mặc dù cũng có dấu hiệu suy giảm sinh trưởng như héo, nhưng vẫn có thể phục hồi sau khi được tưới nước trở lại (Hình 3.20). Khối lượng tươi trung bình của các dòng đậu tương thí nghiệm cũng được xác định nhằm đánh giá tốc độ tăng trưởng của các cây đậu tương chuyển gen trong điều kiện hạn nhân tạo. Sinh khối thu được vào ngày thứ 9 của các dòng đậu tương trong thí nghiệm chịu hạn nhân tạo thể hiện trong hình 3.21.

Kết quả phân tích biểu đồ cho thấy, trong điều kiện đối chứng, sinh khối đạt được của các dòng đậu tương (dòng ĐT22 và các dòng chuyển gen) tương đương nhau, điều này cũng trùng khớp với kết quả đánh giá sinh trưởng của cây thông qua quan sát bên ngoài. Ngược lại, có sự chênh lệch đáng kể trong sinh khối thu được giữa các dòng chuyển gen và dòng ĐT22 dưới điều kiện hạn. Cụ thể, đối với dòng ĐT22, sinh khối thu được trong điều kiện hạn giảm chỉ còn một nửa (đạt 2,56 g) so với sinh khối thu được

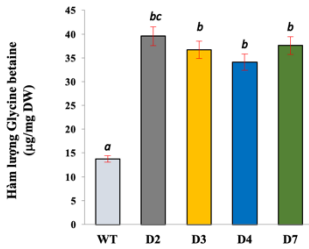
trong điều kiện đối chứng (đạt 6,32 g). Khối lượng tươi và tỷ lệ khối lượng khô/khối lượng tươi của các dòng đậu tương thí nghiệm vào ngày thí nghiệm thứ 9 ở cả hai điều kiện đối chứng và xử lý hạn cho thấy, các dòng đậu tương chuyển gen cũng có sự giảm sinh khối trong điều kiện hạn so với trong điều kiện đối chứng, tuy nhiên lại cao hơn đáng kể so với sinh khối của dòng ĐT22. Như vậy, các dòng đậu tương chuyển gen *codA* đã duy trì được tốc độ tăng trưởng và sinh khối cao hơn cây đậu tương không chuyển gen trong điều kiện hạn nhân tạo.

3.3.3.3. Đánh giá các chỉ số hóa sinh của cây đậu tương chuyển gen dưới điều kiện hạn nhân tạo

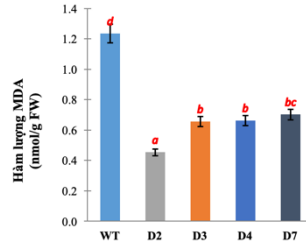
Kết quả phân tích hàm lượng GB hình 3.22 cho thấy, trong tất cả các lá đậu tương chuyển gen, hàm lượng GB đều cao hơn so với ở lá cây ĐT22 không chuyển gen. Cụ thể, hàm lượng GB dao động trong khoảng từ 34,1 đến 39,5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ khối lượng khô (DW). Dòng đậu tương D2 có hàm lượng GB 39,5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ DW tích lũy cao nhất và thấp nhất là dòng D4 là 34,1 $\mu\text{g}/\text{mg}$ DW, trong khi đó trong lá dòng đậu tương không chuyển gen ĐT22 hàm lượng GB chỉ đạt 13,7 $\mu\text{g}/\text{mg}$ DW. Hàm lượng proline của dòng không chuyển gen ĐT22 chỉ đạt 102,9 $\mu\text{g}/\text{g}$ khối lượng tươi (FW), trong khi đó lại tăng cao ở cả 4 các dòng đậu tương chuyển gen và tăng tới 219,6 $\mu\text{g}/\text{g}$ FW ở dòng D4 (hình 3.23).



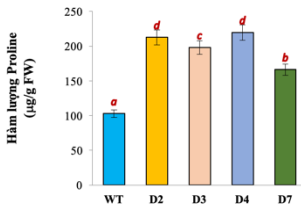
Hình 3.21. Sinh khối thu được vào ngày thứ 9 của các dòng đậu tương trong thí nghiệm chịu hạn nhân tạo



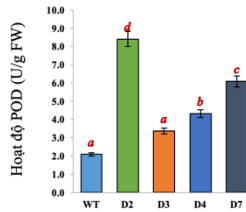
Hình 3.22. Hàm lượng GB của các dòng đậu tương chịu hạn



Hình 3.24. Hàm lượng MDA của các dòng đậu tương chịu hạn



Hình 3.23. Hàm lượng proline của các dòng đậu tương chịu hạn



Hình 3.25. Hoạt độ POD của các dòng đậu tương chịu hạn

D2-D7: các dòng đậu tương chuyển gen thể hệ T_1 , WT: dòng không chuyển gen
Các chữ cái khác nhau trên mỗi cột biểu thị khác biệt ở $P < 0,05$

Chỉ số đánh giá mức độ tổn thương của màng tế bào MDA ở hình 3.24 cho thấy, trong tất cả các dòng đậu tương chuyển gen *codA*, hàm lượng MDA thấp hơn rõ ràng so với dòng cây đối chứng. Trong điều kiện khô hạn, hàm lượng MDA của lá kiểu đại cao, ở mức là 1,234 nmol/g FW, trong khi hàm lượng MDA trong đậu tương chuyển gen giảm từ 0,702 xuống 0,454 nmol/g FW. Những kết quả này chỉ ra rằng cây đậu tương chuyển gen *codA* biểu hiện oxy hóa ít nghiêm trọng hơn và tổn thương ít hơn so với cây không chuyển gen. Hoạt động của POD cũng được biết đến như một chỉ báo về khả năng chống chịu của các giống đậu tương chống lại sự thiếu nước. Phân tích hoạt độ của POD trong hình 3.25 cho thấy trong tất cả các dòng đậu tương chuyển gen là cao hơn hẳn so với dòng đậu tương không chuyển gen ĐT22 chỉ đạt 2,08 U/g FW, trong đó dòng đậu tương chuyển gen D2 cho thấy hoạt độ của POD cao nhất (đạt 8,4 U/g FW). Kết quả này phù hợp với dữ liệu MDA trong hình 3.24, trong đó hàm lượng MDA thấp nhất được quan sát thấy ở dòng chuyển gen D2 (0,45 nmol/g FW).

3.3.4. Thảo luận kết quả biến nạp gen *codA* vào giống đậu tương ĐT22 và thử nghiệm khả năng chịu hạn của một số dòng đậu tương chuyển gen

Trong nghiên cứu này, gen *codA* từ vi khuẩn *A. globiformis* đã được tổng hợp nhân tạo nhằm tối ưu hóa biểu hiện gen ở thực vật dưới sự điều khiển của promoter *rd29A*, *HSP* và *35S* đã được biến nạp thành công vào cây đậu tương. Các kết quả phân tích cây chuyển gen bằng kỹ thuật PCR và Southern blot đã xác nhận sự hiện diện của *codA* trong cây đậu tương chuyển gen. Cây đậu tương chuyển gen cho thấy tốc độ tăng trưởng nhanh hơn, sản xuất sinh khối lớn hơn so với dòng đậu tương đối chứng không chuyển gen ở môi trường gây hạn nhân tạo. Ngoài ra, sự tích lũy hàm lượng GB, proline và hoạt độ của POD cũng cho thấy sự tăng cao trong cây đậu tương chuyển gen dưới sự biểu hiện gen *codA* trong cây đậu tương chuyển gen. Kết quả này phù hợp với một số nghiên cứu được công bố gần đây về sự tăng cường biểu hiện gen *codA* thông qua sự tích lũy hàm lượng GB, proline và hoạt độ của POD ở một số loài thực vật chuyển gen.

Trong nghiên cứu này, hàm lượng GB tích lũy trong cây đậu tương chuyển gen *codA* cao hơn ở dòng cây đậu tương không biến đổi gen khi gặp stress hạn. Hàm lượng GB được tích lũy ở mức độ cao hơn có thể tăng cường áp suất thẩm thấu, giảm sự mất nước do stress hạn của đậu tương chuyển gen và qua đó, duy trì tốc độ phát triển sinh dưỡng và sản xuất sinh khối cao hơn so với cây không chuyển gen. Ngoài GB, proline tự do cũng tích lũy trong thực vật dưới áp lực môi trường. Sau 9 ngày xử lý hạn, hàm lượng proline trong cây đậu tương chuyển gen *codA* đã tăng gấp 1,5- 2 lần so với cây đậu tương ĐT22 không chuyển gen. Nghiên cứu của chúng tôi góp phần khẳng định tầm quan trọng của gen *codA* trong khả năng chống chịu hạn của đậu tương.

Hàm lượng MDA, một axit béo không bão hòa sản xuất peroxy hóa tăng lên là một chỉ số của tổn thương màng tế bào. Ngoài ra, hoạt độ của POD cũng là chỉ số quan trọng trong việc đánh giá khả năng chống chịu của các kiểu gen đậu tương ở điều kiện thiếu nước. Sự gia tăng hoạt độ POD có liên quan đến khả năng chịu hạn cao hơn của các giống đậu tương chuyển gen. Cây đậu tương chuyển gen *codA* có hàm lượng MDA thấp hơn một nửa và hoạt độ của POD cao hơn gấp 4 lần so với cây đậu tương không chuyển gen trong điều kiện khô hạn, cho thấy khả năng làm giảm oxy hóa và hạn chế các tác động làm hỏng màng tế

bào của cây đậu tương chuyển gen *codA*. Những thay đổi lớn về hàm lượng MDA và POD có thể là do vai trò của gen chuyển *codA* và promoter *rd29A* trong cây đậu tương chuyển gen.

KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ

Kết luận

1. Ba vector chuyển gen *pIBTII-35S-codA*, *pIBTII-rd29A-codA*, và *pIBTII-HSP-codA* mang gen *codA* mã hóa choline oxidase, dưới sự điều khiển lần lượt bởi 3 promoter cảm ứng khác nhau: 35S, *rd29A* và *HSP* đã được thiết kế và biến nạp thành công vào cây thuốc lá. Trong điều kiện bất lợi về nhiệt độ, độ ẩm và nước, các dòng thuốc lá chuyển gen đã sống sót và phát triển bằng cách tích lũy hàm lượng glycine betain cao hơn so với cây thuốc lá không chuyển gen.

2. Các yếu tố thích hợp cho chuyển gen *codA* trong cấu trúc *pIBTII/rd29A-codA* vào giống đậu tương ĐT22 đã được xác định. Nồng độ PPT 3 mg/l ở giai đoạn cảm ứng tạo chồi trong môi trường SIM và PPT 1,5 mg/l ở giai đoạn kéo dài chồi trong môi trường SEM cho hiệu quả chọn lọc cao nhất. Dịch *A. tumefaciens* có giá trị $OD_{650} = 0,6$ với thời gian ủ khuẩn 30 phút, đồng nuôi cấy 5 ngày trong tối và diệt khuẩn bằng cefotaxime 500 mg/l thích hợp cho cảm ứng tạo chồi và kéo dài chồi trên môi trường chọn lọc.

3. Cấu trúc *pIBTII/rd29A-codA* được biến nạp thành công vào giống đậu tương ĐT22 và tạo được 4 dòng đậu tương chuyển gen *codA* ở thể hệ T_1 . Các dòng đậu tương chuyển gen ở thể hệ T_1 được kiểm tra bằng Southern blot, Western blot và được đánh giá khả năng chịu hạn trong điều kiện nhân tạo có khả năng sinh trưởng tốt trong điều kiện stress. Sự biểu hiện của gen chuyển *codA* dưới sự điều khiển của promoter *rd29A* làm tăng hoạt động phiên mã của gen *codA* và tăng sinh khối trong cây chuyển gen. Hàm lượng GB tăng cao ở các dòng đậu tương chuyển gen *codA*, dao động từ 34,1 đến 39,5 $\mu\text{g}/\text{mg}$ khối lượng khô, tăng 248,9%- 288,3% so với cây không chuyển gen. Hàm lượng proline tăng 1,5- 2 lần, hoạt động của POD tăng lên gấp 4 lần so với cây không chuyển gen và hàm lượng MDA giảm 0,5 lần trong điều kiện khô hạn.

Đề nghị

Các dòng đậu tương chuyển gen cần được tiếp tục theo dõi, đánh giá tính ổn định của gen chuyển qua các thế hệ và ứng dụng cho các nghiên cứu tiếp theo.

CÁC CÔNG TRÌNH CÔNG BỐ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN ÁN

1. Dong Thi Ta⁺, Dung Manh Ngo⁺, Nhung Hong Nguyen, Ngoc Bich Pham, Phat Tien Do, Ha Hoang Chu (2020), “Production of drought tolerant transgenic soybean expressing *codA* gene under regulation of a water stress inducible promoter”, *Pakistan Journal of Botany*, 52(3), pp. 793-799, (SCIE). (+: These authors contributed equality to this work)
2. Ngô Mạnh Dũng, Tạ Thị Đông, Phạm Bích Ngọc, Chu Hoàng Hà, Chu Hoàng Mậu (2020), “Ảnh hưởng của một số yếu tố đến hiệu quả chuyển gen *codA* vào giống đậu tương ĐT22”, *Tạp chí Khoa học & Công nghệ ĐHTN*, 225(11), pp. 121– 127.
3. Ngô Mạnh Dũng, Tạ Thị Đông, Nguyễn Hồng Nhung, Nguyễn Văn Đoài, Chu Hoàng Hà, Chu Hoàng Mậu (2021), "Cấu trúc và hoạt động của vector chuyển gen thực vật mang gen mã hoá choline oxydase", *Tạp chí Khoa học & Công nghệ ĐHTN*, 226(14), tr 297 - 304.