

XÂY DỰNG QUY TRÌNH BIẾN NẠP GEN *bar* – GEN KHÁNG THUỐC DIỆT CỎ VÀO CÂY KHOAI MÌ (*Manihot esculenta* Crantz) BẰNG PHƯƠNG PHÁP BẮN GEN

Bùi Lan Anh, Nguyễn Phan Cẩm Tú, Trần Nguyên Vũ, Bùi Văn Lệ

Trường Đại học Khoa Học Tự Nhiên, ĐHQG-HCM

(Bài nhận ngày 15 tháng 04 năm 2007, hoàn chỉnh sửa chữa ngày 19 tháng 02 năm 2008)

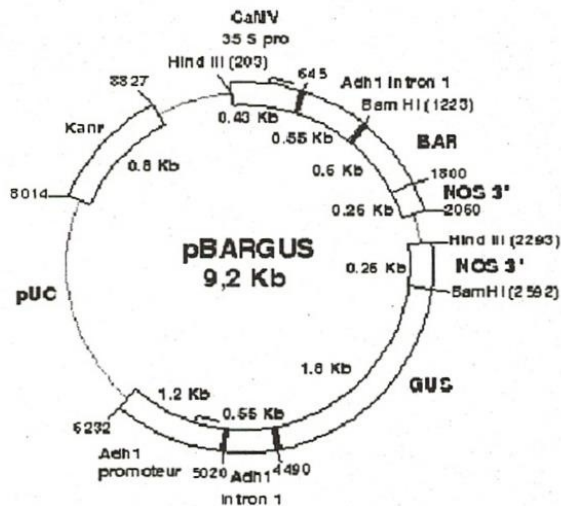
TÓM TẮT: Khoai mì (*Manihot esculenta*) là một trong bốn loại lương thực hàng đầu của Việt Nam, giữ tầm quan trọng cao trong cả nông nghiệp lẫn công nghiệp. Tuy nhiên, sản lượng khoai mì không cao do những khó khăn trong việc trồng trọt như thời gian canh tác dài và bị cỏ dại xâm lấn. Vì thế, rất cần có một giống khoai mì có khả năng kháng thuốc diệt cỏ.

Trong bài báo này, chúng tôi sử dụng phương pháp bắn gen để biến nạp gen *bar* – gen kháng thuốc diệt cỏ Phosphinothricin (PPT) – vào các mẫu mô khoai mì *in vitro* và chọn lọc chồi chuyển gen kháng PPT. Kết quả cho thấy các chồi non *in vitro* có tỉ lệ chuyển gen cao nhất ở khoảng cách bắn 6 cm, áp lực bắn 1100 psi và tỉ lệ hòa trộn DNA-tungsten là 1,5 µg – 1000 µg. Chồi chuyển gen được kiểm tra bằng phương pháp PCR với mỗi đặc hiệu BAR3/BAR4 cho thấy có sự hiện diện của gen *bar* trong mẫu.

Từ khóa: khoai mì – *Manihot esculenta* Crantz – biến nạp gen – bắn gen – gen *bar* – phosphinothricin – GUS.

1. GIỚI THIỆU

Cây khoai mì (*Manihot esculenta* Crantz) là một trong những cây lương thực hàng đầu ở nước ta, giữ tầm quan trọng cao trong cả nông nghiệp lẫn công nghiệp (cung cấp nguyên liệu cho công nghiệp chế biến tinh bột, chế biến thức ăn gia súc và các xưởng chế biến thủ công...)[4]. Vì thế, nhu cầu đòi hỏi một giống cây khoai mì cho sản lượng ưu việt và có khả năng chống chịu các bất lợi từ môi trường ngoài như kháng thuốc diệt cỏ, chống stress, kháng sâu bọ, nấm bệnh... ngày càng cấp thiết. Trong bài báo này, chúng tôi xây dựng quy trình biến nạp gen *bar* – gen kháng thuốc diệt cỏ Phosphinothricin (PPT) – vào cây khoai mì sử dụng phương pháp bắn gen với mong muốn tạo ra một giống cây khoai mì mới có khả năng kháng thuốc diệt cỏ.



Hình 1: Plasmid pBAR-GUS

2. NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Nguyên liệu

Giống *Manihot esculenta* Crantz nhân giống *in vitro* tại Phòng thí nghiệm Công nghệ Sinh học (Lab B), Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG Tp. HCM. Lá non và chồi non cây *in vitro* được sử dụng làm nguyên liệu bản gen.

Plasmid sử dụng là pBAR-GUS mang gen chọn lọc là gen *bar* (gen kháng thuốc diệt cỏ Phosphinothricin - PPT) và gen *gus* (gen chỉ thị) (hình 1).

Môi trường chọn lọc lá non (M1): môi trường Gamborg B5 [5] bổ sung 0,01 mg/L 2,4-D và 16 mg/L PPT.

Môi trường chọn lọc chồi non (M2): môi trường khoáng MS [6] bổ sung 0,01 mg/L 2,4-D, 1 mg/L BA, 1 mg/L GA₃ và 12 mg/L PPT.

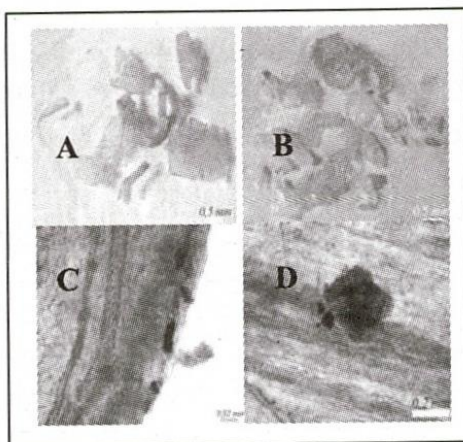
2.2. Phương pháp

Tách chiết plasmid pBAR-GUS trong chủng *E. coli* DH5 α bằng phương pháp SDS-kiềm [1] và kiểm tra độ tinh sạch qua đo OD. Các mẫu có tỉ lệ OD₂₆₀/OD₂₈₀ từ 1,8 – 2 được sử dụng làm nguyên liệu bản gen.

Plasmid được hòa trộn với hạt tungsten theo qui trình P.G. Jones và cộng sự (có cải tiến) [2] với sự thay đổi tỉ lệ hòa trộn giữa tungsten (từ 500 μ g – 1000 μ g) và DNA (từ 0,5 μ g - 1,5 μ g).

Hỗn hợp DNA-tungsten được bắn vào lớp cắt mỏng lá non (0,5 – 1 mm) trên môi trường môi trường M1 không chứa PPT và chồi non (hình thành từ thùy lá non trên môi trường M1 không chứa PPT) đặt trên môi trường M2 bằng súng bắn gen Biolistic® PDS-1000/He của hãng Bio-Rad với khoảng cách bắn từ 6 – 12 cm, áp lực bắn là 1100 psi.

2.3. Kiểm tra kết quả



Hình 2. Mẫu dương tính với thuốc thử GUS

A. Mẫu thử GUS chồi non bản gen.

B. Mẫu thử GUS lá non bản gen.

C. và D. Các điểm màu xanh chàm xuất hiện ở rìa mẫu và trên bề mặt mẫu thử.

Hiệu quả ban đầu của quá trình chuyển gen được ghi nhận thông qua sự biểu của gen *gus* bằng thuốc thử GUS. Sau khi bắn gen 24 giờ, ngâm mẫu với dung dịch thuốc thử GUS ở 37°C, qua đêm và rửa mẫu với ethanol 96%. Sau khi tẩy sạch sắc tố bằng ethanol 96%, những vùng trên mẫu xuất hiện màu xanh chàm đặc trưng là những vùng có dấu hiệu được chuyển gen (mẫu dương tính).

Các chồi chuyển gen được chọn lọc dựa vào khả năng tái sinh và phát triển trên môi trường có PPT. Sau khi thử GUS, mẫu được chuyển sang môi trường chọn lọc lá non (M1) và chồi non (M2),

cây chuyển mỗi hai tuần. Hiệu quả của quá trình chuyển gen được ghi nhận thông qua tỉ lệ % mẫu tái sinh chồi trên môi trường chọn lọc.

Ly trích DNA của những chồi non tái sinh bằng phương pháp CTAB (có cải tiến) [3], bổ sung 2 μ l 2-mercaptoethanol, thực hiện phản ứng PCR với cặp mồi BAR3/BAR4 khuếch đại 1 đoạn nucleotide dài 231 bp nằm trong vùng gen bar. Điện di mẫu PCR trên gel agarose 2%, quan sát và so sánh vạch xuất hiện trên bản điện di với nhau và với thang chuẩn 100 bp.

3.KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết hợp những thí nghiệm thay đổi các yếu tố như khoảng cách giữa vị trí bắn và mô mục tiêu, tỉ lệ hòa trộn DNA-tungsten và loại mô thực vật sử dụng trong chuyển gen cho thấy sự ảnh hưởng quan trọng của các yếu tố này đến hiệu quả chuyển nạp bằng súng bắn gen.

Sau khi ngâm mẫu với thuốc thử GUS, các mẫu thử của chồi non và lá non đều cho tín hiệu dương tính (hình 2A và 2B). Màu xanh chàm đặc trưng thường biểu hiện ở vùng rìa mẫu và trên bề mặt mẫu (hình 2C và 2D).

Qua thống kê tỉ lệ % mẫu thử dương tính (bảng 1) thấy được: tại khoảng cách 6 cm với áp lực bắn là 1100 psi, mẫu chồi non và lá non cho kết quả dương tính với thuốc thử GUS (14,29% đối với lá non và 16,67% đối với chồi non), cao hơn so với hai khoảng cách còn lại. Như vậy, khoảng cách bắn kết hợp với áp lực bắn quyết định mức độ xâm nhập của đạn vào mô mục tiêu. Ở thí nghiệm này, sử dụng áp lực bắn là 1100 psi với khoảng cách 6 cm đã tạo ra một áp lực đủ mạnh để đưa đạn vào các tế bào của mô mục tiêu. Với khoảng cách quá dài (9 cm và 12 cm), áp lực bắn giảm, lực bay của đạn không đủ mạnh để xâm nhập vào mô mục tiêu. Ngược lại, nếu khoảng cách bắn quá ngắn tức áp lực bắn cao, đạn bay mạnh, xuyên qua và không được giữ lại trên khối mô thực vật. Đây là nguyên nhân làm cho hiệu quả chuyển gen kém.

So sánh tỉ lệ % mẫu dương tính ở chồi non và lá non cho thấy, chồi non cho tỉ lệ cao hơn (16,67%) so với lá non (14,29%). Như vậy, hiệu quả chuyển gen không chỉ tùy thuộc vào áp lực bắn và khoảng cách bắn mà còn tùy thuộc từng loại mô thực vật sử dụng.

Bảng 1. Ảnh hưởng của khoảng cách bắn gen lên hiệu quả chuyển gen

	Khoảng cách	Tỉ lệ % mẫu dương tính
Lá non	6	14,29
	9	7,14
	12	0,00
Chồi non	6	16,67
	9	8,33
	12	0,00

Với kết quả bảng 2 cho thấy, khi thay đổi tỉ lệ hòa trộn DNA-tungsten, hiệu quả bắn gen có sự chênh lệch đáng kể. Ở tỉ lệ hòa trộn DNA-tungsten là 1,5 μ g – 500 μ g đối với lá non và 1,0 μ g – 500 μ g đối với chồi non, không thu nhận được mẫu nào dương tính với thuốc thử GUS, hiệu quả bắn gen bằng 0. Vậy, nồng độ DNA quá cao so với lượng tungsten không cho hiệu quả biến nạp tốt. Điều này có thể giải thích do một lượng lớn DNA thêm vào sẽ làm thay đổi kích thước đạn, giảm khả năng xâm nhập của vi đạn vào mô thực vật, cũng có thể sự xuất hiện một lượng lớn DNA trong tế bào thực vật một cách đột ngột sẽ làm ức chế sự gắn chèn DNA vào trong bộ gen thực vật. Mặt khác, nếu nồng độ tungsten quá cao so với lượng DNA cũng không thể hiện hiệu quả biến nạp gen ưu thế. Trong thí nghiệm bắn gen với tỉ lệ hòa trộn có lượng tungsten cao (tỉ lệ DNA-tungsten

là 0,5 μg – 1000 μg), hiệu quả bắn gen thu được là rất thấp (4,76% đối với lá non và 8,34% đối với chồi non). Tỷ lệ hòa trộn DNA-tungsten cho hiệu quả bắn gen cao nhất ở cả mẫu chồi non và lá non là tỷ lệ 1,5 μg DNA – 1000 μg tungsten, với tỷ lệ dương tính với thuốc thử GUS là 28,57%.

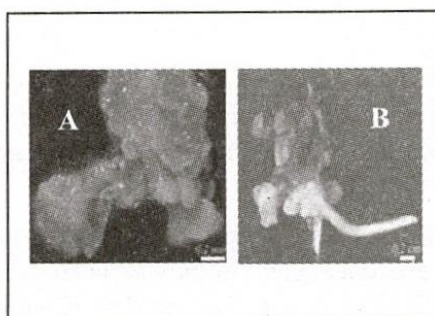
Bảng 2. Ảnh hưởng của tỷ lệ hòa trộn DNA-tungsten lên hiệu quả chuyển gen

Tungsten DNA	Tỷ lệ % mẫu dương tính với thuốc thử GUS					
	Lá non			Chồi non		
	500 μg	750 μg	1000 μg	500 μg	750 μg	1000 μg
0,5 μg	27,78	9,52	4,76	16,67	14,29	8,34
1,0 μg	4,76	7,15	4,76	0,00	9,52	7,15
1,5 μg	0,00	23,81	28,57	22,22	23,81	28,57

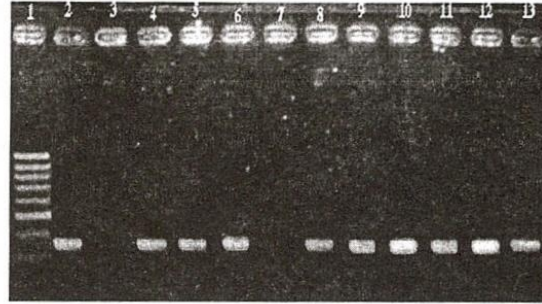
Sau 3 tuần nuôi cấy trên môi trường chọn lọc có PPT, các mẫu chồi non chuyển gen vẫn xanh tốt và tiếp tục phát triển, trong khi đó các mẫu không chuyển gen hóa nâu và chết (hình 3A). Tỷ lệ chồi non thu nhận được là 20%. Đối với mẫu lá non cắt mỏng, các mẫu không chuyển gen hóa nâu và chết dần trong khi các mẫu chuyển gen vẫn xanh tươi. Nhưng sau nhiều tuần nuôi cấy, các mẫu lá chuyển gen trên môi trường chọn lọc lại không cảm ứng hình thành được phôi. Do vậy, không thu nhận được cây chuyển gen tái sinh từ lá non khoai mì.

Tóm lại, tuy cả chồi non và lá non đều cho kết quả dương tính với thuốc thử GUS. Tuy nhiên, trên môi trường tái sinh thì chỉ với mẫu chồi non bắn gen là cho ra được cây con chuyển gen (hình 3B). Như thế, khả năng tái sinh của các mô thực vật cũng ảnh hưởng lớn đến khả năng chuyển gen của mô đó. Trong trường hợp này, chồi non là vật liệu thích hợp hơn so với lá non.

Kết quả điện di sau khi chạy PCR với cặp mồi BAR3/BAR4, cho thấy, 9/10 mẫu DNA li trích từ những chồi tái sinh cho tín hiệu khuếch đại tại vị trí khoảng 231 bp so với thang chuẩn (hình 4). Ở giếng 7, có hiện tượng “escape” xảy ra trên chồi chuyển gen. Mẫu đối chứng âm là mẫu DNA trích từ lá non khoai mì chưa chuyển gen (giếng 3) và mẫu đối chứng dương là mẫu plasmid pBAR-GUS (giếng 2). Hai mẫu đối chứng sau khi chạy điện di đều chứng tỏ phản ứng PCR không bị ngoại nhiễm và cặp mồi sử dụng đặc hiệu cho việc kiểm tra cây chuyển gen ở *Manihot esculenta* Crantz. Như vậy, kết quả chứng minh cây con khoai mì tái sinh có mang gen bar và biểu hiện khả năng kháng thuốc diệt cỏ PPT.



Hình 3. Cây con tái sinh trên môi trường chọn lọc.
A. Chồi non tái sinh sau 3 tuần chọn lọc.
B. Cây con đã hình thành rễ sau 6 tuần.



Hình 4. Kết quả điện di sản phẩm PCR

- Giếng 1 : thang chuẩn 100bp.
- Giếng 2 : đối chứng dương, sử dụng plasmid pBAR-GUS.
- Giếng 3 : đối chứng âm tính.
- Giếng 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13: mẫu DNA cần kiểm tra sự hiện diện của gen *bar*.

4.KẾT LUẬN

Chúng tôi đã bước đầu biến nạp thành công gen *bar* – gen kháng thuốc diệt cỏ Phosphinothricin (PPT) vào chồi non cây khoai mì *Manihot esculenta* Crantz bằng phương pháp bắn gen với tỉ lệ chuyển gen cao nhất ở khoảng cách bắn 6 cm, áp lực bắn 1100 psi và tỉ lệ hòa trộn DNA-tungsten là 1,5 μg – 1000 μg . Tỉ lệ chồi non chuyển gen thu nhận được là 20%. Chồi non chuyển gen sau khi được kiểm tra bằng phương pháp PCR với mỗi đặc hiệu cho thấy có sự xuất hiện của gen *bar* trong các mẫu DNA bộ gen khoai mì. Tuy nhiên, cần phải thực hiện thêm các nghiên cứu khác như trồng thử nghiệm tính kháng thuốc diệt cỏ PPT, lai phân tích tính trạng, quan sát và phân tích hình thái và năng suất củ... để cho ra một dòng cây khoai mì mới, hoàn chỉnh có khả năng kháng PPT với sản lượng củ không đổi.

STUDY ON *BAR* GENE TRANSFORMATION INTO *MANIHOT ESCULENTA* CRANTZ BY BIOLISTIC METHOD

Bui Lan Anh, Nguyen Phan Cam Tu, Tran Nguyen Vu, Bui Van Le
University of Natural Sciences, VNU-HCM

ABSTRACT: *Cassava (Manihot esculenta) is the fourth important crop of Vietnam, not only in agriculture but also in industry. The productivity is not so much because of difficulty in planting due to a long time of cultivation and the invasion of weeds. Therefore, it is extremely important to create a herbicide resistant cultivar.*

In this paper, we used biolistic transformation to transform the bar gene – PPT (Phosphinothricin) herbicide resistance gene – into in vitro cassava samples and selected the transgenic shoots resisting PPT. The result showed that in vitro early shoots had the highest transgenic ratio at 6 cm fire distance with 1000 μg tungsten and 1.5 μg DNA mix. The transgenic shoots had been proved to carry bar gene by PCR with its specific primers BAR3/BAR4.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Birnboim, H.C. *A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA*. Methods Enzymol. 100, 243 – 255 (1983).
- [2]. Denchev P.D., Songstad D.D., McDaniel J.K., Conger B.V. *Transgenic orchardgrass (Dactylis glomerata) plants by direct embryogenesis from microprojectile bombarded leaf cells*. Plant Cell Reports 16, 813 – 819 (1997).
- [3]. Doyle J.J., Doyle J.L. *Isolation of plant DNA from fresh tissue*. Focus. 12, 13 – 15 (1990).
- [4]. Hoàng Kim Anh, Ngô Kế Sương, Nguyễn Xích Liên. *Tinh bột sắn và các sản phẩm từ tinh bột sắn*, NXB Khoa học và kỹ thuật, chương 1, trang 7-15.
- [5]. Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. *Nutrient requirement of suspension cultures of soybean root cultures*. Exp. Cell Res. 50, 151–158 (1968).
- [6]. Murashige T. , Skoog F. *A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures*. Physiol. Plant. 15, 473 – 497 (1962).
- [7]. Raemakers C.J.J.M., Jacobssen E., Visser R.G.F. *Regeneration and transformation of cassava. The Graduate School Experimental Plant Sciences, Department of Plant Breeding, Agricultural University Wageningen, P.O. Box 386, 6700 AJ Wageningen. The Netherlands, 153 – 161 (1997)*.
- [8]. Zhang P. M.Sc. in Plant Science, *Studies on cassava (Manihot esculenta Crantz) transformation towards: genetic improvement*. South China Institute of Botany, Academia Sinica, P.R. China, 7 – 17 (2000).