

NGHIÊN CỨU CHUYỂN GEN VÀO MỘT SỐ GIỐNG KHOAI LANG VIỆT NAM (*IPOMEA BATATAS L.*) THÔNG QUA VI KHUẨN *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

Vũ Thị Lan^{1,2*}, Mai Thị Phương Nga²,
Phạm Bích Ngọc², Chu Hoàng Hà², Lê Trần Bình²

¹Trường Đại học Khoa học – ĐH Thái Nguyên; ²Viện Công nghệ Sinh học

TÓM TẮT

Trong bài báo này, chúng tôi trình bày một số kết quả đánh giá hiệu quả chuyển gen *Gus* vào sáu giống khoai lang (Chiêm Dâu, Hoàng long, KB1, KLC266, Tự nhiên, VD1) nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* thông qua biểu hiện tạm thời của gen *Gus* ở các mẫu thí nghiệm. Kết quả nghiên cứu cho thấy, các giống khoai lang nghiên cứu đều có tỉ lệ *Gus* dương tính ở các mẫu thí nghiệm là khá cao và không có sự khác biệt rõ rệt về sự biểu hiện tạm thời của gen *Gus* giữa các giống. Tuy nhiên, tỉ lệ chuyển gen giữa các chủng vi khuẩn là khác nhau, C58/pGV2260 và EHA105 cho kết quả chuyển gen cao hơn LBA 4404 và phù hợp cho chuyển gen vào một số giống khoai lang Việt Nam. Các mảnh cây có nguồn gốc khác nhau từ cây có độ tuổi khác nhau cũng được nghiên cứu, kết quả các mảnh cây từ đỉnh chồi có sự biểu hiện tạm thời của gen *Gus* cao hơn so với các mảnh cây từ mảnh lá và cuống lá.

Từ khóa: *Agrobacterium tumefaciens*, chuyển gen, giống, *Ipomoea batatas L.*, nhuộm *Gus*

MỞ ĐẦU

Khoai lang (*Ipomoea batatas L.*) thuộc họ Khoai lang (Convolvulaceae). Khoai lang là cây hai lá mầm và là cây trồng lục bội với số bội thể $2n=90$ [4]. Ở nước ta, khoai lang là cây trồng chiếm một vị trí quan trọng trong sản xuất lương thực, đứng thứ 3 sau lúa và ngô. Tuy nhiên, sản xuất khoai lang bị hạn chế bởi những thiệt hại nghiêm trọng do côn trùng và sâu bệnh. Vì vậy, hướng ứng dụng các phương pháp công nghệ sinh học hiện đại để chuyển các gen của vi khuẩn Bt vào cây khoai lang để tạo giống mới có khả năng kháng lại sâu bệnh và côn trùng đang rất được quan tâm.

Hiện nay, các nhà chọn tạo giống khoai lang Việt Nam đã chọn ra nhiều giống mới có triển vọng như: Giống số 8, K51, KL5, KB1, TV1, H.1.2, giống khoai lang cực nhanh, giống khoai lang 143. Ngoài ra, một số giống khoai lang địa phương cũng có chất lượng tốt, được người tiêu dùng ưa chuộng như: Hoàng long, Chiêm dâu, Lim, Bí, Đà Nẵng... [3]. Chính vì vậy, chúng tôi tiến hành khảo sát trong tập đoàn giống khoai lang để lựa chọn ra một số

giống có khả năng tái sinh tốt và có khả năng tiếp nhận gen bằng phương pháp chuyển gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* phục vụ việc chuyển gen kháng bọt hà ở khoai lang.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu nghiên cứu là đỉnh sinh trưởng, mảnh lá, cuống lá của sáu giống khoai nuôi cấy *in vitro* gồm Chiêm Dâu, Hoàng long, KB1, KLC266, Tự nhiên, VD1.

Chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* sử dụng gồm chủng EHA105, C58/pGV2260, LBA 4404 mang gen chỉ thị *Gus* để kiểm tra biểu hiện tạm thời của gen và gen *nptII* kháng kanamycin để chọn lọc tế bào chuyển gen.

Vật liệu và chủng vi khuẩn sử dụng do Phòng Công nghệ tế bào thực vật, Viện Công nghệ sinh học, Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam cung cấp.

Phương pháp nghiên cứu:

Tạo dịch huyền phù *Agrobacterium tumefaciens*

Cây trái *A. tumefaciens* cất giữ trong glycerol lên đĩa môi trường LB thạch có bổ sung kháng sinh phù hợp, nuôi ở 28°C trong 48 -

* Tel: 0914 504250, Email: lanvtdhkhmn@gmail.com

96 giờ. Sau đó, lấy một khuẩn lạc vi khuẩn nuôi trong môi trường LB lỏng có bổ sung kháng sinh phù hợp và nuôi lắc ở tốc độ 220 vòng/phút ở 28°C. Sau 8 - 12 giờ, lấy dịch huyền phù vi khuẩn nuôi cấy trên ly tâm với tốc độ 4500 vòng/ phút, ở 4°C trong 10 phút. Loại bỏ dịch nổi và hoà tan cạn với môi trường 1/2 MS và pha loãng cho tới OD₆₀₀ ≈ 0,6 - 0,8. Dịch huyền phù vi khuẩn này có thể được sử dụng để biến nạp ngay hay có thể giữ ở 4 °C trong 1 - 2 giờ.

Nhiễm vi khuẩn và đồng nuôi cấy

Nguyên liệu sau khi cắt nhỏ được ngâm trong dịch huyền phù vi khuẩn khoảng 30 phút và được đặt lên môi trường cộng sinh và nuôi trong tối ba ngày, ở nhiệt độ 26°C ± 2 °C.

Phân tích sự biểu hiện tạm thời của gen Gus (Theo phương pháp của Jefferson & CS, 1987)

Các mảnh cây sau ba ngày nuôi cộng sinh được nhuộm với dung dịch 5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide (X-gluc), để 8-12 giờ trong tối ở nhiệt độ 37 °C. Sau đó rửa bằng cồn 70 % ba lần và quan sát dưới kính hiển vi. Những vùng có gen Gus nhuộm màu xanh lam [1].

Phương pháp bố trí thí nghiệm:

+ **Ảnh hưởng của chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* đến sự biểu hiện tạm thời của gen Gus của sáu giống khoai lang:** Chuyển gen Gus đối với ba chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* là C58/pGV2260, EHA105 và LBA4404 chứa vector mang gen Gus (pCB-Gusplus).

+ **Ảnh hưởng của tuổi cây đến sự biểu hiện tạm thời của gen Gus ở sáu giống khoai lang:** Mảnh lá, cuống lá, đỉnh chồi từ cây khoai *in vitro* ở hai loại độ tuổi khác nhau là chồi cây *in vitro* ở thí nghiệm tạo đa chồi khoảng 2 tuần tuổi và cây khoai lang *in vitro* trưởng thành 2 - 4 tuần tuổi để làm nguyên liệu chuyển gen bằng hai chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* là C58/pGV2260 và EHA105.

+ **Nghiên cứu ảnh hưởng của kích thước mảnh cắt đến sự biểu hiện tạm thời của gen Gus:** Sử dụng các nguồn nguyên liệu có kích thước khác nhau của sáu giống khoai lang: 1):

Kích thước của cuống và đỉnh ngọn dài 1-1,5cm, lá có kích thước 0,3 x 0,5 cm; Loại 2): Mảnh lá, cuống lá và đỉnh chồi cắt dài 0,3-0,5cm.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* đến sự biểu hiện tạm thời của gen Gus của sáu giống khoai lang

Hiệu quả chuyển gen Gus bằng ba chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* vào sáu giống khoai lang có sự khác biệt nhau rõ rệt. Kết quả thu được về biểu hiện tạm thời của gen Gus ở sáu giống khoai lang nghiên cứu cho thấy, chủng vi khuẩn C58/pGV2260 và EHA105 cho tỉ lệ biểu hiện Gus là tương đương nhau và tỉ lệ này cao hơn hẳn so với tỉ lệ biểu hiện Gus dương tính của chủng vi khuẩn LBA4404 ở tất cả các loại nguồn nguyên liệu được biến nạp của sáu giống khoai lang nghiên cứu. Ở mảnh cắt đỉnh chồi, chủng C58/pGV2260 và EHA105 có tỉ lệ Gus dương tính đạt 80 - 100%, còn chủng LBA4404 đạt thấp từ 25 - 80%. Các loại mảnh cắt khác như cuống lá và mảnh thì hiệu quả chuyển gen của chủng LBA 4404 đều đạt thấp.

Mặt khác, chúng tôi cũng nhận thấy loại mẫu cây biến nạp khác nhau có ảnh hưởng rõ rệt đến hiệu quả chuyển gen. Đỉnh chồi khi chuyển gen bằng chủng C58/pGV2260 và EHA105 cho tỉ lệ biểu hiện Gus cao nhất đạt từ 70 - 100%, mẫu cuống lá và mảnh lá, tỉ lệ này thấp hơn rất nhiều chỉ đạt 10 - 40 %.

Từ kết quả nghiên cứu này, chúng tôi bước đầu lựa chọn sử dụng hai chủng vi khuẩn C58/pGV2260 và EHA 105 cho các thí nghiệm biến nạp tiếp theo.

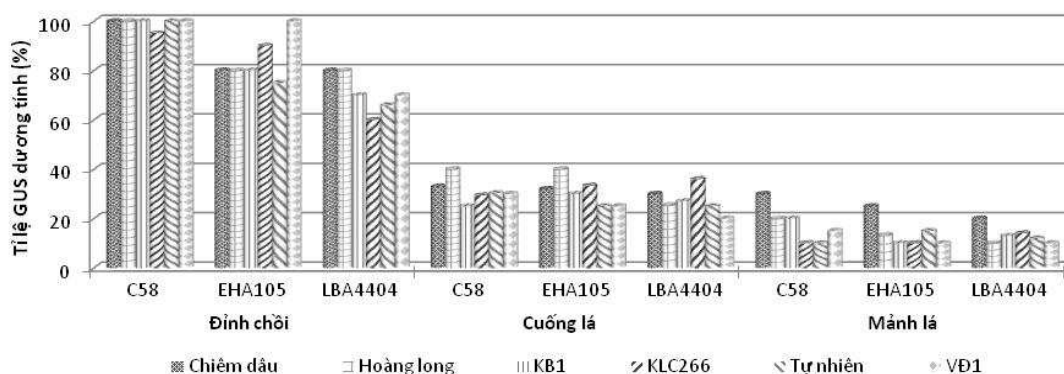
Ảnh hưởng của tuổi cây đến sự biểu hiện tạm thời của gen Gus ở sáu giống khoai lang

Kết quả thực nghiệm khi chuyển gen Gus bởi hai chủng C58/pGV2260 và EHA105 cho tỉ lệ Gus dương tính cao nhất ở chồi ngọn (đỉnh sinh trưởng) so với nguyên liệu mảnh lá và cuống lá ở hầu hết các giống. Hiệu quả chuyển gen ở mẫu đỉnh chồi của hai loại mẫu nghiên cứu của chủng C58/pGV2260 cũng cao hơn so với của chủng EHA105.

Bảng 1. Ảnh hưởng của chủng vi khuẩn đến hiệu quả chuyển gen của sáu giống khoai lang

| ST T | Giống khoai lang | Loại nguyên liệu | Tỉ lệ biểu hiện GUS (%) ở chủng vi khuẩn: | | | Mức độ biểu hiện Gus |
|---------|---------------------|------------------------|---|---------|----------|-------------------------|
| | | | C58/pGV2260 | EHA 105 | LBA 4404 | |
| 1 | Chiêm dâu | Đỉnh chồi | 100 | 80 | 80 | ++ |
| | | Cuống lá | 33 | 32 | 30 | + |
| | | Mảnh lá | 30 | 25 | 20 | +,++ |
| 2 | Hoàng long | Đỉnh chồi | 80 | 83,3 | 25 | ++ |
| | | Cuống lá | 40 | 40 | 25,5 | + |
| | | Mảnh lá | 20 | 13,3 | 10 | +,++ |
| 3 | KB1 | Đỉnh chồi | 100 | 80 | 70 | ++ |
| | | Cuống lá | 25 | 30 | 27 | + |
| | | Mảnh lá | 20 | 10 | 13 | +,++ |
| 4 | KLC266 | Đỉnh chồi | 95 | 90 | 60 | ++ |
| | | Cuống lá | 29,4 | 33,3 | 36 | + |
| | | Mảnh lá | 10 | 10 | 14 | +,++ |
| 5 | Tự nhiên | Đỉnh chồi | 100 | 75 | 66 | ++ |
| | | Cuống lá | 30,3 | 25 | 25 | + |
| | | Mảnh lá | 10 | 15 | 12 | +,++ |
| 6 | VĐ1 | Đỉnh chồi | 100 | 100 | 70 | ++ |
| | | Cuống lá | 30 | 25 | 20 | + |
| | | Mảnh lá | 15 | 10 | 10 | +,++ |

Ghi chú: “-“: chưa chuyển gen; +: có biểu hiện; ++: biểu hiện mạnh

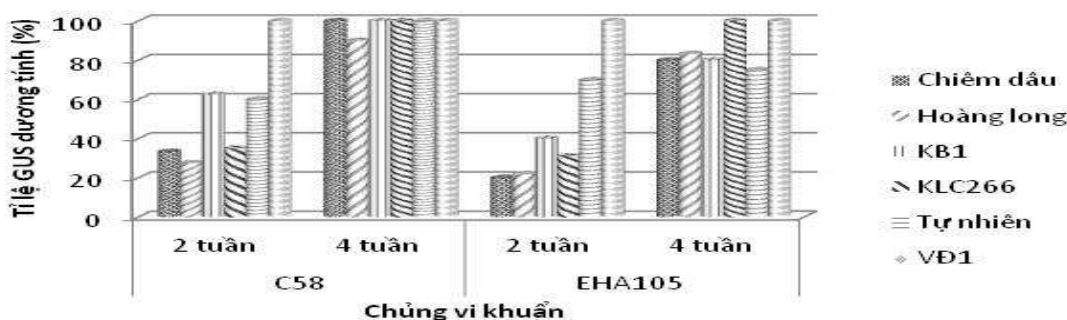
**Hình 1.** Hiệu quả chuyển gen *Gus* thông qua ba chủng vi khuẩn ở đỉnh chồi, cuống lá và mảnh lá của sáu giống khoai lang

Kết quả thu được ở bảng 2 cho thấy: đỉnh chồi của cây in vitro hai tuần tuổi là nguyên liệu có tỉ lệ *Gus* dương tính đạt 20 - 70%, tỉ lệ này thấp hơn so với chồi ngọn của cây in vitro trưởng thành bốn tuần tuổi (80 - 100%). Đối với nguyên liệu lá và cuống lá thì hiệu quả chuyển gen không theo quy luật nào, nó phụ thuộc vào giống. Mẫu lá có tỉ lệ dương tính khi nhuộm *Gus* thấp (10 - 30%) nhưng mức độ biểu hiện lại mạnh (thể hiện ở các chấm xanh đậm, rõ). Mẫu cuống lá, tỉ lệ *Gus* dương tính cao hơn ở mẫu lá (20 - 40%) nhưng biểu hiện yếu, có màu xanh nhạt ở hai đầu hoặc hai phần ba cuống. Tuy nhiên, hoạt động của gen *Gus* biểu hiện mạnh nhất ở phần cuống

của lá thứ 2 từ trên đỉnh ngọn của chồi ngọn, phiến lá non cũng có biểu hiện màu xanh chàm nhưng diện tích nhỏ, đôi khi là các chấm xanh chàm đậm, nhỏ.

Bảng 2. Ảnh hưởng của tuổi cây đến đến sự biểu hiện tạm thời của gen *gus*

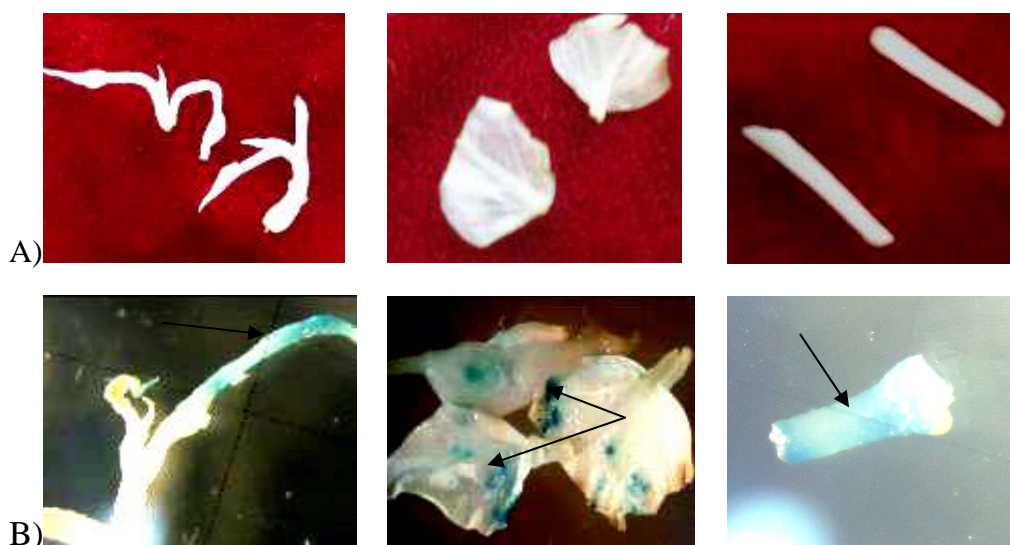
| ST T | Giống khoai lang | Loại nguyên liệu | Tỉ lệ Gus ⁺ (%) khi chuyển gen bằng chủng C58/pGV2260 ở cây: | | Tỉ lệ Gus ⁺ (%) khi chuyển gen bằng chủng EHA105 của cây: | |
|---------|------------------------|------------------------|--|--------|---|--------|
| | | | 2 tuần | 4 tuần | 2 tuần | 4 tuần |
| 1 | Chiêm dâu | Đỉnh chồi | 33,3 | 100 | 20 | 80 |
| | | Cuống lá | 26 | 33 | 19 | 32 |
| | | Mảnh lá | 16,6 | 30 | 18,2 | 25 |
| 2 | Hoàng Long | Đỉnh chồi | 27,5 | 90 | 22 | 83,3 |
| | | Cuống lá | 25 | 40 | 20 | 40 |
| | | Mảnh lá | 14,5 | 20 | 15 | 13,3 |
| 3 | KB1 | Đỉnh chồi | 62,5 | 100 | 40 | 80 |
| | | Cuống lá | 40 | 25 | 33,3 | 30 |
| | | Mảnh lá | 19,5 | 20 | 25 | 10 |
| 4 | KLC26 6 | Đỉnh chồi | 35 | 100 | 31 | 100 |
| | | Cuống lá | 23,5 | 29,4 | 19,5 | 33,3 |
| | | Mảnh lá | 18,3 | 10 | 22,2 | 10 |
| 5 | Tự nhiên | Đỉnh chồi | 60 | 100 | 70 | 75 |
| | | Cuống lá | 58,75 | 30,3 | 39,4 | 25 |
| | | Mảnh lá | 22,5 | 10 | 26,6 | 15 |
| 6 | VĐ1 | Đỉnh chồi | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | | Cuống lá | 30 | 30 | 25 | 25 |
| | | Mảnh lá | 22,5 | 15 | 26,6 | 10 |



Hình 2. Ảnh hưởng của tuổi cây đến hiệu quả chuyển gen *gus* ở đỉnh chồi của sáu giống khoai khi chuyển gen bằng chủng C58 và EHA105

Nghiên cứu ảnh hưởng của kích thước mảnh cắt đến sự biểu hiện tạm thời của gen *Gus*

Đối với chuyển gen bằng vi khuẩn thì việc làm tổn thương mẫu và độ lớn của mẫu có ảnh hưởng quan trọng đến hiệu quả chuyển gen. Kết quả nghiên cứu cho thấy, mẫu cắt có kích thước nhỏ cho hiệu quả chuyển gen cao hơn rất nhiều ở nguyên liệu chồi ngọn. Với nguyên liệu chồi ngọn cắt nhỏ (loại 2), hiệu quả chuyển gen rất cao đạt 90 % (Hoàng long) và 100% ở năm giống còn lại. Tuy nhiên, đối với mảnh lá và cuống lá thì hiệu quả chuyển gen ở cả hai loại kích thước có sự khác biệt không nhiều và không theo quy luật. Điều này có thể do phụ thuộc vào giống.



Hình 3. Kết quả biểu hiện tạm thời gen Gus ở các nguyên liệu khác nhau khi nhuộm X-gluc (Theo thứ tự từ trái sang phải: ngọn, mảnh lá, cuống lá): A) Mẫu không chuyển; B) Mẫu chuyển gen biểu hiện hoạt động gen Gus (Mũi tên chỉ những vùng biểu hiện gen Gus)

KẾT LUẬN

1. Các giống khoai lang nghiên cứu đều có tỉ lệ Gus dương tính khá cao và không có sự khác biệt rõ rệt về sự biểu hiện tạm thời của gen Gus.

2. Chủng C58/pGV2260 và EHA105 phù hợp cho chuyển gen vào một số giống khoai lang Việt Nam.

Đỉnh chồi có sự biểu hiện tạm thời của gen Gus cao hơn so với mảnh lá và cuống lá. Kích thước mảnh cắt nhỏ (0,3 - 0,5cm) cho hiệu quả chuyển gen cao hơn mảnh cắt có kích thước lớn (đối với mẫu đỉnh ngọn).

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW, (1987), " GUS fusion: β glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker higher plants". EMBO J 6:3901-3907.
- [2]. Garía R, Somontes D, Zaldúa Z, Mena J, López A, Morán R, Arencibia AD, Quiroz K Caligari PDS, (2008), "Efficient regeneration and *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of recalcitrant sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) cultivars", *Asia Pacific Journal of Molecular Biotechnology*, Vol. 16(2): 25-33.
- [3]. Hoàng Kim, (2011), *Giống khoai lang ở Việt Nam*, truy nhập từ địa chỉ <http://foodcrops.blogspot.com/>.
- [4]. Đinh Thế Lộc, (1995), *Cây khoai lang*, Nxb Nông nghiệp.

SUMMARY

STUDY ON GENE TRANSFORMATION OF VIETNAMESE SWEET POTATO CULTIVARS VIA *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

**Vũ Thị Lan^{1,2*}, Mai Thi Phương Nga²,
Phạm Bích Ngọc², Chu Hoàng Hà², Lê Trần Bình²**
¹College of Sciences - TNU, ²Institute of Biotechnology

In this study, gene transformation method of six Vietnamese sweetpotato cultivars (*Ipomea batatas* L.) via *Agrobacterium tumefaciens* containing pCB-Gusplus vector was optimized. The explants used for transformation with pCB-Gusplus were subjected to Gus assay after co-cultivation stage. The results showed high transient Gus expression in all three types of explants (from shoots, leave and petioles) of all cultivars. However, the level of transient GUS expression in meristem explants (70 - 100%) is higher than petiole and leaf explants (10 - 40%). The size of explants also affected in efficiency of gene transformation, small explant (size 0,3 - 0,5cm) was more efficient than large explants (1,0 - 1,5cm). Furthermore, the efficiency of gene transformation among three *A. tumefaciens* strains (C58/pGV2260, EHA105, LBA4404) was different. *Agrobacterium* strains EHA105 and C58 resulted in greater proportion of explants expressing Gus gene in all genotypes than LBA4404 strain.

Key words: *Agrobacterium tumefaciens*, sweetpotato cultivar, transient Gus expression, transformation, *Ipomea batatas* L.

* Tel: 0914 504250, Email: lanvtdhkhmn@gmail.com