

**ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN  
TRƯỜNG ĐẠI HỌC SƯ PHẠM**

**ĐẶNG THỊ HOÀNG HÀ**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC  
NGHIÊN CỨU CHUYỂN GEN GUS VÀO  
GIỐNG NGÔ LVN99 VIỆT NAM**

**Người hướng dẫn: TS. Chu Hoàng Mậu**

**Thái Nguyên, năm 2016**

## MỞ ĐẦU

### 1. Đặt vấn đề

Cây ngô (*Zea mays* L.) là một trong năm loại cây lương thực chính của thế giới. Ở Việt Nam, ngô là cây trồng quan trọng thứ hai sau lúa gạo. Hạt ngô chứa khá đầy đủ các chất dinh dưỡng cho người và gia súc. Trong những năm gần đây sản xuất ngô ở Việt Nam tăng nhanh nhờ sự thúc đẩy của ngành chăn nuôi và công nghiệp chế biến.

Hạt ngô cũng như các loại ngũ cốc khác dễ bị một xâm hại . Một ngô (*Sitophilus zeamais* Motsch.) là loại đa thực, chúng có thể ăn được hầu hết các loại ngũ cốc, các loại đậu, hạt có dầu và nhiều sản phẩm thực vật khác. Thức ăn thích hợp nhất với mọt là hạt ngô và gạo. Mọt trưởng thành dùng vòi khoét một lỗ sâu vào hạt, rồi đẻ trứng ở đó và tiết ra một thứ dịch nhầy để bít kín lỗ đó lại. Sâu non nở ra trong hạt ngô, thường ăn phôi trước, sau đó mới đến nội nhũ và các bộ phận khác làm cho hạt chỉ còn lại một lớp vỏ mỏng. Khi đầy sức, sâu non đục những lỗ nhỏ lộ rõ trên hạt để vũ hoá bay ra ngoài [16]. Defensin thực vật là peptide cation và thuộc về một siêu họ lớn của các peptide kháng khuẩn. Defensin thực vật hoạt động sẽ tổng hợp protein ức chế, ảnh hưởng đến chức năng kênh protein màng, làm suy yếu vi sinh vật, tăng cường khả năng chống chịu kềm, làm thay đổi trạng thái oxi hoá khử ascorbic acid và đặc biệt ức chế hoạt động của  $\alpha$ -amylase ở côn trùng [16]. Liu và cs (2006) đã phân lập *defensin 1* từ cây đậu xanh (VrD1) và chứng minh được vai trò chống côn trùng, kháng mọt của protein VrD1. VrD1 ức chế hoạt động của  $\alpha$ -amylase cho nên kìm hãm sự tiêu hóa tinh bột trong ruột mọt [23]. Năm 2008, Pelegrini và cs đã thông báo phân lập protein defensin1 từ cây đậu đũa (VuD1) có khả năng ức chế hoạt động của  $\alpha$ -amylase ở ấu trùng mọt [25].

Các giống ngô lai cho năng suất cao nhưng sản lượng, giá thành, chất lượng bị giảm nhiều do hạt của các giống ngô này rất dễ bị mọt xâm hại. Hiện nay, nhiều biện pháp bảo quản hạt ngô sau thu hoạch đã được áp dụng , nhưng

tổn thời gian, hiệu quả thấp và tổn thất sau thu hoạch vẫn rất lớn. Nghiên cứu ứng dụng công nghệ sinh học hiện đại tạo giống ngô kháng một đang được nhiều nhà khoa học quan tâm, trong đó có chi ến lược tạo cây ngô chuyển gen kháng một ở Việt Nam. Do vậy việc nghiên cứu xây dựng quy trình chuyển gen ở cây ngô làm cơ sở cho việc chuyển thành công gen *defensin* vào giống ngô Việt Nam phục vụ tạo dòng ngô chuyển gen có khả năng kháng một cao là rất cần thiết. Xuất phát từ những lý do trên chúng tôi đã xây dựng và thực hiện đề tài luận văn thạc sĩ là: “**Nghiên cứu chuyển gen *gus* vào giống ngô LVN 99 Việt Nam**”.

## **2. Mục tiêu nghiên cứu**

Xác định được tuổi phôi non thích hợp cho biến nạp gen thông qua *A. tumefaciens* và đề xuất được quy trình chuyển gen ở cây ngô.

## **3. Nội dung nghiên cứu**

3.1. Nghiên cứu khả năng tái sinh *in vitro* của tuổi phôi ngô non phục vụ chuyển gen và ảnh hưởng của mật độ tế bào vi khuẩn *A. tumefaciens*, nồng độ acetosyringone (AS), nồng độ kanamycin và thời gian nhiễm khuẩn đến hiệu quả chuyển gen *gus* ở giống ngô lai LVN99.

3.2. Nghiên cứu chuyển gen *gus* và tạo cây ngô chuyển gen từ giống ngô lai LVN99.

## **4. Ý nghĩa khoa học và thực tiễn của đề tài**

Về khoa học, kết quả nghiên cứu đã xác định được tuổi phôi non thích hợp đối với sự tái sinh *in vitro* và hoàn thiện quy trình tái sinh từ phôi ngô non phục vụ chuyển gen ở ngô. Chuyển thành công gen *gus* và đề xuất quy trình chuyển gen vào giống LVN99.

Về thực tiễn, kết quả chuyển thành công gen *gus* và tạo cây ngô chuyển gen là cơ sở của việc ứng dụng quy trình chuyển gen ở ngô nhằm tạo cây ngô chuyển gen có sự tăng cường khả năng chống chịu các stress từ ngoại cảnh.

## Chương 1. TỔNG QUAN TÀI LIỆU

### 1.1. CÂY NGÔ

#### 1.1.1. Nguồn gốc, đặc điểm sinh học của cây ngô

Cây ngô có tên khoa học là *Zea mays* L., thuộc chi *Maydeae*, họ hoà thảo (*Gramineae*), bộ hoà thảo (*Graminales*). Từ loài *Zea mays* Line, dựa vào cấu trúc nội nhũ của hạt và hình thái bên ngoài, ngô được phân thành các loài phụ: ngô đá rần, ngô răng ngựa, ngô nếp, ngô đường, ngô nõ, ngô bột, ngô nửa răng ngựa. Từ các loài phụ dựa vào màu hạt và màu lõi ngô được phân chia thành các thứ. Ngoài ra ngô còn được phân loại theo sinh thái học, nông học, thời gian sinh trưởng và thương phẩm.

Căn cứ vào hầu hết các kết quả khảo cổ học, các dẫn liệu lịch sử và tế bào học... cho thấy ngô có nguồn gốc từ châu Mỹ. Tuy nhiên dạng ngô đại hiện không còn tồn tại nên có nhiều giả thuyết khác nhau về nguồn gốc di truyền của cây ngô. Điều quan trọng nhất là hình thành vô số loài phụ, các thứ và nguồn di hợp thể của cây ngô, các dạng cây và biến dạng của chúng đã tạo cho nhân loại một loài ngũ cốc có giá trị đứng cạnh lúa mì và lúa nước [32].

Cơ quan sinh dưỡng của cây ngô gồm rễ, thân, lá làm nhiệm vụ duy trì đời sống cá thể. Hạt được coi là cơ quan khởi đầu của cây.

Sau khi gieo hạt, ngô phát triển thành cây mầm. Cây mầm chủ yếu sử dụng nguồn dinh dưỡng chứa trong nội nhũ hạt. Bộ phận phía trên hạt phát triển lên mặt đất gồm có trụ giữa lá mầm. Phần đỉnh trụ lá mầm có mấu bao lá mầm, từ đó phát sinh bao lá mầm và bên trong bao lá mầm là thân lá mầm. Trên trục của cây mầm, một đầu hình thành rễ cây mầm, sau đó phát triển thành rễ chính, từ rễ chính hình thành các rễ phụ.

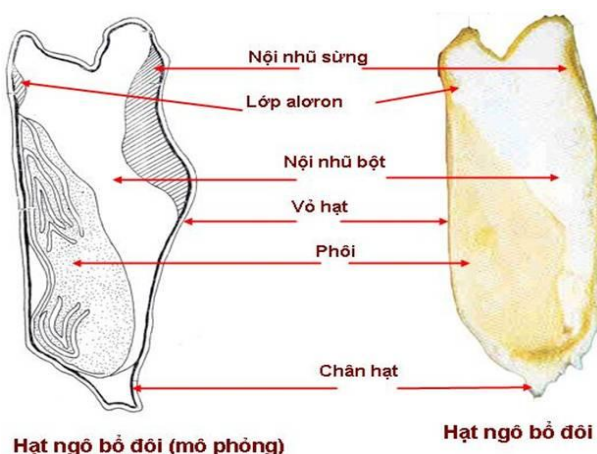
Ngô là cây có hệ rễ chùm tiêu biểu cho bộ rễ cây hoà thảo. Hệ rễ có 3 loại: rễ mầm, rễ đốt và rễ chân kiềng. Ngô ra lớp rễ đốt đầu tiên lúc 3- 4 lá mầm và mọc theo thứ tự từ dưới lên trên. Rễ đốt giúp cho cây ngô hút nước và dinh dưỡng. Rễ chân kiềng mọc xung quanh các đốt phần thân sát gốc trên mặt đất, rễ này giúp cây chống đổ, bám chặt vào đất và tham gia vào hút nước và thức ăn cho cây. Số lượng rễ, số lông rễ và độ dài rễ khác nhau ở mỗi giống. Đây là chỉ tiêu quan trọng để đánh giá khả năng chịu hạn của cây.

Thân cây ngô thường phát triển mạnh, thẳng, cứng, dạng bèn chắc. Thân chia làm nhiều giống, các giống nằm giữa các đốt, các giống dài và to dần từ dưới lên.

Lá ngô mọc từ mắt trên đốt và mọc đối xứng xen kẽ nhau. Độ lớn và số lá ngô dao động từ 6 – 22 là tùy thuộc vào giống và điều kiện tự nhiên. theo hình thái và vị trí lá trên cây, lá ngô được chia thành các nhóm: lá mầm, lá thân, lá ngọn, lá bi. Lá ngô trưởng thành bao gồm các bộ phận: bẹ lá, phiến lá, thìa lá. Trên lá có rất nhiều khí khổng. Cơ chế đóng mở của lỗ khí khổng liên quan chặt chẽ tới điều kiện hạn hán.

Bắp ngô phát sinh từ mầm nách lá trên thân. Số mầm nách lá trên thân nhiều nhưng chỉ 1 – 3 mầm nách trên cùng phát triển thành bắp. Tùy thuộc vào giống, điều kiện sinh thái và chăm sóc, thời vụ mà số bắp trên cây, số hạt trên bắp, vị trí đóng bắp, thời gian phun râu và trỗ cờ... là khác nhau.

Hạt ngô thuộc loại quả dĩnh gồm 4 bộ phận chính: vỏ hạt, lớp aloron, phôi và nội nhũ (Hình 1.1). Phía dưới hạt có gốc hạt gắn liền với lõi ngô. Vỏ hạt bao bọc xung quanh, màu sắc vỏ hạt tùy thuộc vào từng giống. Nằm sau lớp vỏ hạt là lớp aloron bao bọc lấy nội nhũ và phôi. Nội nhũ là bộ phận chính chiếm 70- 78% trọng lượng hạt, thành phần chủ yếu là tinh bột, ngoài ra có chứa protein, lipid, vitamin, khoáng và enzym để nuôi phôi phát triển. Phôi ngô lớn (chiếm 8- 15%) nên cần chú trọng bảo quản [32].



**Hình 1.1.** Sơ đồ hạt ngô bắp dọc [43].

Các chất trong hạt ngô dễ được đồng hoá nên có giá trị dinh dưỡng cao. Hạt ngô chứa phần lớn tinh bột. Hàm lượng tinh bột ở ngô tẻ nhiều hơn ngô nếp (68% so với 65%) và được chia thành tinh bột mềm (tinh bột bột) và tinh bột cứng (tinh bột sừng). Ngô nếp được cấu tạo hoàn toàn từ amilopectin nên có độ dẻo hơn ngô tẻ. Hàm lượng lipid cao thứ hai trong các loại hạt ngũ cốc (3,5- 7%) và phụ thuộc vào từng giống, điều kiện tự nhiên. Lipid được tập trung ở phôi và tầng aloron. Dầu ngô chứa đến 50% axit linoleic liên kết với các glyxerit, axit oleic, panmitic, rixinic. Hàm lượng lipid là một chỉ tiêu quan trọng để đánh giá chất lượng hạt.

Phôi ngô chiếm 1/3 thể tích của hạt và gồm có các phần: ngù (phần ngăn cách giữa nội nhũ và phôi), lá mầm, trụ dưới lá mầm, rễ mầm và chồi mầm [32].

### 1.1.2. Tình hình sản xuất ngô trên thế giới và Việt Nam

Ngô vừa là cây lương thực, vừa là cây thức ăn cho gia súc. Ngô là cây có địa bàn phân bố rộng rãi nhất. Trong những năm gần đây, diện tích ngô trên toàn thế giới tăng lên gấp rưỡi, năng suất tăng gấp 2,5 lần. Diện tích, sản lượng và năng suất ngô trên thế giới có xu hướng tăng qua các năm từ niên vụ 2001 – 2002 đến niên vụ 2014 – 2015. Diện tích từ 173,3 triệu ha trong niên vụ 2001 – 2002 tăng lên 177,4 triệu ha trong niên vụ 2013 – 2014, tăng 29% trong vòng 13

niên vụ. Năng suất cũng tăng 26% trong giai đoạn 2001 – 2013. Sản lượng ngô thế giới tăng 63%, bình quân 4,2%/năm. Trong đó, sản lượng tăng do tăng diện tích là 2,2%/năm và do tăng năng suất là 2%. Hoa Kỳ là nước dẫn đầu về sản lượng ngô, đạt trên 353 triệu tấn trong niên vụ 2013 – 2014, kế đến là Trung Quốc đạt trên 217 triệu tấn. Đứng hàng thứ ba là Brazil với sản lượng 80,5 triệu tấn, khối EU-27 đứng thứ tư với sản lượng gần 65 triệu tấn. Tổng lượng cung ngô trên thế giới có xu hướng tăng liên tục từ niên vụ 2001 đến 2014, bình quân 3,6%/năm chủ yếu do tăng sản lượng hàng năm. Lượng ngô dự trữ qua các năm biến động không lớn, năm dự trữ thấp nhất là 104 triệu tấn, năm cao nhất 152 triệu tấn, trung bình khoảng 131 triệu tấn/năm.

Ở Việt Nam, các giống ngô lai được trồng ở hầu hết các địa phương có đất cao dễ thoát nước: Đông Nam Bộ, Tây Nguyên, các tỉnh miền núi phía Bắc, đồng bằng sông Hồng, Duyên hải miền Trung. Trong khi đó, các giống ngô địa phương chủ yếu tập trung ở khu vực miền núi phía Bắc và đang đứng trên nguy cơ bị xói mòn quỹ gen. Diện tích, năng suất, sản lượng ngô trong 5 năm (2011-2015) gần như tăng không đáng kể (Bảng 1.1).

**Bảng 1.1.** Diện tích, năng suất và sản lượng ngô trong 5 năm (2011 - 2015) ở Việt Nam

	2011	2012	2013	2014	2015
Diện tích (1000 ha)	1121,3	1156,6	1179,5	1200,0	1300,0
Năng suất (tạ/ha)	43,1	43,0	44,3	44,5	45,0
Sản lượng (1000 tấn)	4835,6	4973,6	5188,5	5625,0	5980,0

“Nguồn: Bản đồ thương mại thế giới” [42]

Năng suất giống ngô địa phương thường thấp nhưng có ưu điểm như chất lượng cao, khả năng chịu hạn và kháng sâu bệnh tốt và có thể gieo trồng trên nhiều loại đất khác nhau. Vì vậy, việc sưu tập, nghiên cứu và đánh giá một cách toàn diện nguồn gen các giống ngô địa phương là hết sức cần thiết cho công tác giống, và bảo tồn nguồn gen quý.

## 1.2. NGHIÊN CỨU NUÔI CẤY PHÔI NGÔ

### 1.2.1. Lịch sử về nuôi cấy phôi ngô

Lịch sử nuôi cấy *in vitro* cây ngô được bắt đầu từ rất sớm vào những năm 1930, khi Lampe và Mills nuôi cấy nội nhũ và phôi non trong môi trường có bổ sung dịch chiết khoai tây [49], nhưng mô chỉ sinh trưởng có giới hạn. Lần đầu tiên nuôi cấy liên tục trong một thời gian dài là nghiên cứu của Larue, phôi non và phôi trưởng thành của ngô được nuôi cấy để xác định nhu cầu dinh dưỡng cho sự sinh trưởng và phát triển [22].

Tái sinh cây từ phôi non hoặc bộ phận khác của những loài ngũ cốc lần đầu tiên được miêu tả trong những năm 1960 đến 1980 [36]. Phôi non đã được sử dụng làm nguồn vật liệu chính trong các nghiên cứu nuôi cấy mô ngô. Lu sử dụng phôi có kích thước 1 - 1,5 mm thu được sau 2 tuần thụ phấn được cấy vào môi trường MS bổ sung 2,4-D từ 0,25 đến 2,0 mg l<sup>-1</sup> và sucrose từ 3 đến 12% [23].

Năm 1987, Wang đã tái sinh thành công từ phôi trưởng thành của hai dòng B73 và Mo17, nhưng khả năng tái sinh phụ thuộc nhiều vào kiểu gen và tỉ lệ tái sinh rất thấp (4 – 5 %). Đối với dòng ngô A632 đã không thu được cây tái sinh [38].

Năm 1989, Vain và cs đã đánh giá ảnh hưởng của ethylene trong nuôi cấy mô, AgNO<sub>3</sub> được sử dụng như một chất ức chế hoạt động của ethylene. Tỉ lệ tạo mô sẹo dạng II (mô sẹo xốp, vàng, cho tỉ lệ tái sinh cao) được nâng cao khi phôi non được nuôi cấy trong môi trường MS chứa AgNO<sub>3</sub> từ 5 đến 20 mg/l. Nghiên



cứu đã chỉ ra rằng khả năng tái sinh của mô sẹo trong môi trường có  $\text{AgNO}_3$  được tăng cao [36].

Năm 2004, Zhang và cs đã nghiên cứu 15 dòng ngô Tangsipingtou thuần bằng nuôi cấy *in vitro* để đánh giá ảnh hưởng của kiểu gen, môi trường, chất kích thích sinh trưởng và phương pháp tạo mô sẹo có nguồn gốc từ phôi non và tái sinh cây. Nghiên cứu cho thấy mô sẹo có thể được tạo ra từ tất cả 15 dòng được thử nghiệm và khả năng tái sinh cây giảm đến một mức độ nhất định cùng với sự già hóa của mô sẹo [41].

Shohael và đồng tác giả (2003) tiến hành nghiên cứu trên 3 dòng CML-161; CML-323; CML-327. Phôi non được nuôi cấy trên môi trường N6, tỉ lệ tạo mô sẹo giao động từ 56,33 đến 72,0 %. Kết quả cho thấy môi trường đạt tỉ lệ mô sẹo cao nhất (72,0 %) là môi trường N6 có bổ sung L-proline 2,3 g/l, casein hydrolysate 200 mg/l và 2,4-D 1,0 mg/l. Khi nuôi cấy trong môi trường MS, tỉ lệ mô sẹo được tạo ra từ 39,0 đến 68,66 %. Môi trường cho tỉ lệ mô sẹo cao nhất (68,66%) là MS có bổ sung L-asparagine 150 mg/l, thiamin 50 mg/l và 2,4-D mg/l. Cây được tái sinh thành công trong môi trường MS và N6 không bổ sung chất điều hòa sinh trưởng đạt tỉ lệ tương ứng là từ 52,83 đến 61,0 % và từ 35,66 đến 42,49 % [29].

Năm 2004, Huang và Wei đã tái sinh cây thành công từ phôi trưởng thành của 7 dòng ngô nội phối với tần số tương đối cao (19,8 - 32,4 %). Và đặc biệt với dòng Mo17 đạt 25,6% [18].

Binott và cs (2005) nuôi cấy phôi non từ 12 dòng ngô bố mẹ thuần chủng và con lai tương ứng của chúng để đánh giá khả năng tạo mô sẹo, phôi hóa và tái sinh cây. Hạt non thu ở các giai đoạn khác nhau 10, 15, 18, 21 và 24 ngày tuổi sau khi thụ phấn và được khử trùng bề mặt. Phôi non được cấy vào môi trường tạo mô sẹo bao gồm môi trường cơ bản N6 bổ sung 2,4-D 0 - 2 mg/l; L-proline 2,87 g/l; casein hydrolysate 0,1 g/l, glycine 2 g/l, sucrose 30 g/l và gelrite 3 g/l. Mô

seọ được hình thành ở nồng độ 2,4-D 2 mg/l từ 80 đến 90 % đối với phôi non của con lai và từ 50 đến 80 % từ phôi non của dòng bố mẹ. Khả năng phôi hóa được tiến hành ở 6 dòng thuần và 4 dòng lai. Tuy nhiên cây chỉ tái sinh được ở 4 dòng thuần và 3 dòng lai [5].

Năm 2011, Gorji và đồng tác giả đã nghiên cứu khả năng tạo mô seọ và tái sinh cây của 6 dòng ngô thuần là B73, Oh28, Va35, Gss0966, Vog134 và Hi34. Kết quả cho thấy trong môi trường N6 cho tần số tạo mô seọ cao nhất khi bổ sung Dicamba 2 mg/l, trên môi trường MS có bổ sung 2,4-D ở nồng độ 1 mg/l thì cho tần số tạo mô seọ cao nhất. Mặt khác, môi trường N6 có bổ sung Dicamba thúc đẩy quá trình tạo mô seọ cao hơn so với môi trường N6 bổ sung 2,4-D cả về tỉ lệ cũng như chất lượng của mô seọ. Trong 6 dòng ngô được thử nghiệm thì dòng Va35, Gss0966, Vag134 và Hi34 có mô seọ tốt nhất. Bên cạnh đó, dòng Va35 có tỷ lệ hình thành chồi từ các mô cấy cao hơn là dòng Vog134. Kết quả nghiên cứu còn cho thấy tỉ lệ hình thành rễ cao nhất trên khi đưa chồi vào môi trường MS có bổ sung NAA 2 mg/l. Mô cấy của hai dòng Va35 và Vog134 trên môi trường MS có bổ sung BAP 1 mg/l và IAA 0,5 mg/l thúc đẩy tần số hình thành chồi cao, tỉ lệ tái sinh cây đạt từ 53 đến 67% [16].

Ở Việt Nam, cây ngô cũng được nghiên cứu nuôi cấy nhằm phục vụ cho việc chuyển gen. Năm 2005, Phạm Thị Lý Thu đã nghiên cứu xây dựng hệ thống tái sinh từ phôi non ngô. Kết quả nghiên cứu cho thấy tần số tạo mô seọ của 2 dòng ngô HR8 và HR9 đạt 75,2 % và 74,1 %, tỷ lệ tái sinh cây đạt 24,9 % và 21,4 % [1]. Năm 2009, Nguyễn Văn Đồng và cs đã tiến hành nghiên cứu khả năng tái sinh từ phôi non của 45 dòng ngô Việt Nam thuộc 3 nhóm ngô tẻ, ngô nếp và ngô ngọt, sử dụng dòng đối chứng là dòng ngô mô hình HR8 có khả năng tái sinh cao. Kết quả nghiên cứu thu được 4 dòng ngô tẻ VH1, VH11, VH19, VH29; 3 dòng ngô nếp VHN9, VHN10, VHN16 và 2 dòng ngô ngọt VHD2, VHD5 có khả năng tái sinh cao đồng thời mang một số đặc tính nông học tốt được sử dụng làm nguồn vật liệu cho nghiên cứu chuyển gen [1].