

## CHUYỂN GEN *ZmDEF1* VÀO GIỐNG NGŨ ĐỊA PHƯƠNG SI MA CAI THÔNG QUA *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

Hoàng Thị Huệ Khang<sup>1</sup>, Bùi Thị Minh Thúy<sup>1</sup>,  
Trần Thị Hồng<sup>1</sup>, Vi Thị Xuân Thủy<sup>2</sup>, Chu Hoàng Mậu<sup>1\*</sup>  
<sup>1</sup>Trường Đại học Sư phạm - ĐH Thái Nguyên, <sup>2</sup>Trường Đại học Tây Bắc

### TÓM TẮT

Defensin thực vật là protein đa chức năng, có khả năng ức chế quá trình dịch mã, ảnh hưởng đến chức năng của kênh màng, làm suy yếu vi sinh vật, tăng cường khả năng chống chịu stress, làm thay đổi trạng thái oxi hoá khử của ascorbic acid và đặc biệt ức chế hoạt động  $\alpha$ -amylase của ruột côn trùng. Bài báo này trình bày kết quả chuyển gen *ZmDEF1* (*defensin1*) phân lập từ cây ngô địa phương có khả năng kháng mọt cao vào giống ngô Si Ma Cai. Kết quả 3 lần biến nạp gen *ZmDEF1* vào 90 phôi ngô non thu được 15 chồi, có 8 chồi ra rễ và 5 cây trồng trong nhà lưới. Kiểm tra sự có mặt của gen chuyển trong 5 cây chuyển gen bằng kỹ thuật PCR, cả 5 cây ngô chuyển gen đều dương tính. Hiệu suất chuyển gen là 5,56%. Kết quả này là cơ sở để tiếp tục nghiên cứu tạo cây ngô chuyển gen có khả năng kháng lại mọt hại ngô.

**Từ khóa:** Chuyển gen qua *Agrobacterium*, defensin thực vật, *ZmDEF1* gen, ức chế  $\alpha$ -amylase, phôi ngô

### MỞ ĐẦU

Cây ngô (*Zea mays* L.) là một trong những cây ngũ cốc chính có năng suất cao và giá trị kinh tế lớn của loài người. Ngô có hàm lượng tinh bột khoảng 71%, 9-10% là protein, 9% là lipid nên ngô đã, đang là thức ăn chủ yếu của khoảng 50% tổng dân số, nguyên liệu chế biến thức ăn gia súc, nguyên liệu cho nhiều ngành công nghiệp chế biến thủ công mỹ nghệ...[3]. Trên thế giới, ngô là một trong những đối tượng nghiên cứu chính trong khoa học nông nghiệp và đã trở thành đối tượng chuyển gen đang được quan tâm rất lớn. Nhu cầu về lương thực, thức ăn chăn nuôi và nhiên liệu trên thế giới ngày một tăng [5]. Tuy nhiên, tổn thất sau thu hoạch ở ngô do côn trùng đã làm hạn chế an ninh lương thực trên toàn thế giới [6]. Trong thời gian lưu trữ tại kho, sự tổn thất do sâu hại gây ra là hơn 30% sản lượng. Hơn nữa, năng suất, sản lượng ngô bị biến động lớn bởi tác động của hạn hán, nó gây giảm trung bình 15% sản lượng trên toàn cầu tương đương với hơn 120 triệu tấn bị mất đi hàng năm [6].

Defensin là peptide cation, thuộc về một siêu họ lớn của các peptide kháng khuẩn, được tìm

thấy trong nhiều nhóm. Defensin thực vật phân bố rộng rãi trong giới thực vật, có cấu trúc không gian nhỏ, hình cầu với thành phần cơ bản khoảng 45 - 54 amino acid, giàu cysteine. Chúng là protein đa chức năng, có khả năng ức chế quá trình dịch mã, ảnh hưởng đến chức năng của kênh màng, làm suy yếu vi sinh vật, tăng cường khả năng chống chịu stress, làm thay đổi trạng thái oxi hoá khử ascorbic acid, ức chế protease và đặc biệt ức chế hoạt động  $\alpha$ -amylase của ruột côn trùng [4]. Với khả năng ức chế enzyme tiêu hóa của côn trùng cụ thể là  $\alpha$ -amylase mở ra hướng ứng dụng sử dụng defensin thực vật trong bảo vệ nông sản khỏi tác hại của sâu hại an toàn, bền vững. Defensin từ cây đậu xanh (VrD1) đã được chứng minh có khả năng ức chế hoạt động  $\alpha$ -amylase của một đậu xanh [8], hay defensin phân lập từ cây đậu đũa (VuD1) cũng cho thấy có khả năng ức chế hoạt động của  $\alpha$ -amylase một đậu đỏ và một bột vàng [9]. Như vậy, tăng hàm lượng defensin trong hạt sẽ nâng cao khả năng ức chế  $\alpha$ -amylase từ mọt và cải thiện được khả năng kháng mọt của cây ngô.

Gen *defensin1* phân lập từ cây ngô địa phương giống Mai Sơn (*ZmDEF1*) có khả năng kháng mọt ngô cao, được sử dụng để

\* Tel: 0913 383289, Email: chuhoangmau@tnu.edu.vn

thiết kế vector chuyển gen trong mục đích tăng cường biểu hiện protein *defensin1* [2]. Giống ngô Si Ma Cai là giống địa phương có khả năng kháng một ngô thấp do vậy chuyển gen *ZmDEF1* vào giống ngô Si Ma Cai qua phôi non nhằm tạo các dòng ngô có khả năng kháng một cao.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Vật liệu

Sử dụng phôi non của giống ngô địa phương Si Ma Cai do Trung tâm giống cây trồng Lào Cai cung cấp làm vật liệu nhận gen; chủng vi khuẩn *A.tumefaciens* C58 mang cấu trúc *pBetaPhaso-ZmDEF1* chứa gen *ZmDEF1* được phân lập từ giống ngô Maison có khả năng kháng một cao [2].

Các môi trường nuôi cấy mô được sử dụng theo Frame và cs (2002) [7] và Trần Thị Lương và cs (2014) [1], bao gồm: Môi trường đồng nuôi cấy (A1), môi trường chọn lọc mô sẹo lần 1 (A2), môi trường chọn lọc mô sẹo lần 2 (A3), môi trường nuôi phục hồi (A4), môi trường tái sinh tạo đa chồi (A5) và môi trường tạo rễ (A6).

### Phương pháp nghiên cứu

#### Phương pháp chuyển gen qua phôi ngô non

Phương pháp chuyển gen vào phôi ngô non thông qua *A. tumefaciens* được tiến hành dựa trên phương pháp của Frame và cs (2002), Trần Thị Lương và cs (2014) [1], [7].

**Chuẩn bị vật liệu chuyển gen:** Bắp ngô non thụ phấn khoảng 12 - 14 ngày, bóc bỏ lớp vỏ ngoài bắp, để lại 2-3 lớp vỏ mỏng ngoài, khử trùng bề mặt bắp ngô bằng cồn 70%. Dùng dao tách phôi ngô trong điều kiện vô trùng.

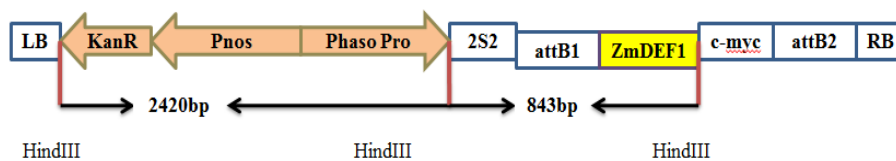
**Tạo dịch huyền phù vi khuẩn *A. tumefaciens*:** Nuôi chủng *A. tumefaciens* C58 chứa gen *ZmDEF1* trên môi trường LB đặc có bổ sung spectomycin (50 mg/l) và rifamycin (50 mg/l)

trong tủ ấm 28° C, trong 48 giờ. Dùng que lấy một lượng nhỏ khuẩn trên đĩa đặc, nuôi cấy trong LB lỏng để trong tủ ấm lắc 2000 vòng/phút ở 28° C trong 16 giờ. Sau đó, lấy 1 ml dịch khuẩn nuôi trong 10 ml LB lỏng có bổ sung kháng sinh spectomycin 50 mg/l và rifamycin 50 mg/l, nuôi trong tủ ấm 28° C trong 4 giờ. Ly tâm dịch khuẩn và hòa tan trong môi trường MS dịch với mật độ khuẩn  $OD_{660nm} = 0,6-0,8$ .

**Biến nạp và đồng nuôi cấy:** Phôi ngô non được ngâm trong dịch huyền phù vi khuẩn trong 30 phút, bổ sung 150  $\mu$ M acetosyringone sau đó thấm khô, cấy trên môi trường đồng nuôi cấy A1 và phôi được nuôi trong tối 3 ngày.

**Diệt khuẩn, nuôi cấy và chọn lọc mô sẹo chuyển gen:** Sau 3 ngày, phôi ngô được rửa bằng dung dịch cefotaxim 500 mg/l trong 20 phút. Thấm khô bằng giấy thấm và cấy trên môi trường A2 (bổ sung kanamycine 50 mg/l) để chọn lọc mô sẹo chuyển gen lần 1. Sau 1 tuần, chuyển phôi sang môi trường chọn lọc A3 (bổ sung kanamycine 25mg/l) để chọn lọc mô sẹo chuyển gen lần 2. Sau 1 tuần nuôi cấy, chọn các mô sống sót chuyển sang môi trường phục hồi A4 để trong tối 1 tuần, để mô sẹo tăng kích thước.

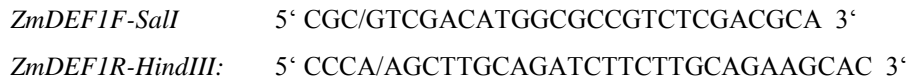
**Tái sinh cây, tạo rễ và đưa cây ra môi trường tự nhiên:** Các mô sẹo sau khi xử lý chuyển gen và chọn lọc nuôi phục hồi trong môi trường A4 trong 1 tuần được đưa vào môi trường tái sinh A5 bổ sung BAP hoặc kinetin 2,0 mg/l. Sau 1 tuần chồi được tái sinh chuyển sang môi trường A6 bổ sung NAA (IBA) 0,5 mg/l để tạo rễ. Sau khoảng 2 tuần được cây con hoàn chỉnh. Cây ngô con sẽ được cho ra bầu trong giá thể Tribat. Sau 7 đến 10 ngày các cây được đưa ra trồng trong nhà lưới.



**Hình 1.** Sơ đồ cấu trúc *pBetaPhaso-ZmDEF1* (*Phaso Pro*: Promoter Phaseoline; *attB1* và *attB2*: các vị trí tái tổ hợp trong phản ứng RB; LB: Bờ trái T-DNA; RB: Bờ phải T-DNA; KanR: gen kháng kanamycine)

### Phương pháp kiểm tra sự có mặt của gen chuyển *ZmDEF1* bằng Kỹ thuật PCR

Tách chiết DNA tổng số từ lá cây chuyển gen và thực hiện phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu *ZmDEF1F-SalI/ZmDEF1R-HindIII* để xác định sự có mặt của gen *ZmDEF1* trong cây chuyển gen. Kiểm tra kết quả bằng điện di trên gel agarose 0,8%. Cặp mồi *ZmDEF1F-SalI/ZmDEF1R-HindIII* có trình tự nucleotide là:



### Phương pháp tính hiệu suất chuyển gen

Hiệu suất chuyển gen được tính theo công thức:

$$\text{Hiệu suất chuyển gen} = \frac{\text{Số cây chuyển gen mang gen chuyển}}{\text{Tổng số mẫu biến nạp}} (\%)$$

### KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### Chuyển cấu trúc mang gen *ZmDEF1* vào phôi ngô *Simacai* nhờ *A. tumefaciens* và tái sinh cây chuyển gen

Hình 2 mô tả quá trình chuyển gen vào giống ngô Si Ma Cai qua phôi ngô non nhờ *A. tumefaciens*. Phôi ngô non tách từ hạt được ngâm trong dịch huyền phù vi khuẩn *A. tumefaciens* tái tổ hợp trong 30 phút, bổ sung acetosyringone 150  $\mu\text{M}$ , cây trên môi trường đồng nuôi cấy A1 (Hình 2.A1) và nuôi trong tối 3 ngày. Chọn lọc mô sẹo chuyển gen trên môi trường A2 lần 1 (Hình 2.A2), chọn lọc mô sẹo chuyển gen lần 2 (Hình 2.A3). Tăng trưởng mô sẹo trên môi trường nuôi phục hồi A4 (Hình 2.A4). Tạo đa chồi ở môi trường A5 (Hình 2.A5). Các chồi chuyển sang môi trường A6 để tạo rễ (Hình 2.A6). Sau 3 tuần cây con ra bầu trong giá thể Tribat và sau 7 đến 10 ngày các cây được đưa ra trồng trong nhà lưới.

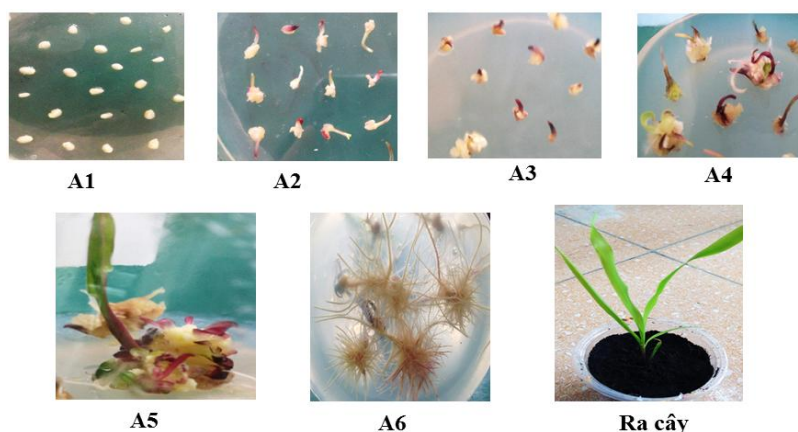
Tiến hành 3 lần biến nạp cấu trúc pBetaPhaso-*ZmDEF1* vào phôi ngô non giống ngô *Simacai*, mỗi lần 30 phôi, kết quả biến nạp được trình bày ở bảng 1.

Kết quả bảng 1 cho thấy, biến nạp gen *ZmDEF1* vào phôi ngô non với tổng số phôi là 90 phôi cấy trên môi trường đồng nuôi cấy A1 và phôi được nuôi trong tối 3 ngày. Sau 3 ngày, chuyển phôi cấy trên môi trường A2 để chọn lọc mô sẹo chuyển gen, sau 1 tuần ta thu được 25 phôi sống sót. Số phôi sống sót chuyển phôi sang môi trường chọn lọc A3 để chọn lọc mô sẹo chuyển gen lần 2, sau một tuần nuôi cấy thu được 13 phôi sống sót và

chuyển sang môi trường phục hồi A4, có 12 phôi tăng được kích thước. Có 9 phôi hóa chồi và tạo đa chồi ở môi trường tái sinh A5 để tạo chồi. Số chồi tạo thành là 15 chồi trên môi trường A5 và 8 chồi được tạo rễ trong môi trường A6. Sau 2 đến 3 tuần chồi được tạo rễ đầy đủ. Số cây ra bầu đất là 5 cây, cây được cho ra huấn luyện ở bầu với giá thể Tribat có chứa đầy đủ các thành phần dinh dưỡng, muối khoáng cần thiết cho sự sinh trưởng, phát triển của cây. Sau 7 đến 10 ngày các cây trồng trong bầu được đưa trồng ra nhà lưới với tổng số cây là 5 cây. Đồng thời trồng 5 cây ngô không chuyển gen (ở lô *ĐC1*) để làm đối chứng.

#### Kiểm tra sự có mặt của gen chuyển *ZmDEF1* ở các cây ngô chuyển gen bằng kỹ thuật PCR

Cây ngô chuyển gen của sau khi trồng ra đất, dùng lá để tách DNA tổng số và thực hiện phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu *ZmDEF1F-SalI/ZmDEF1R-HindIII* để khuếch đại gen chuyển *ZmDEF1*. Trong cây ngô chuyển gen, gen *ZmDEF1* có gen nội tại và gen chuyển, chúng phân biệt nhau ở đặc điểm có và không có intron. Khi thực hiện PCR bằng cặp mồi đặc hiệu, gen *ZmDEF1* nội tại có cả exon và intron với kích thước 345 bp, trong khi gen chuyển *ZmDEF1* chỉ có exon, không có intron với kích thước 243bp [2]. DNA tổng số từ lá của 5 cây ngô chuyển gen sau khi được tinh sạch, thực hiện phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu *ZmDEF1F-SalI/ZmDEF1R-HindIII*. Kết quả kiểm tra sản phẩm PCR trên gel agarose 0,8% được thể hiện ở hình 3.

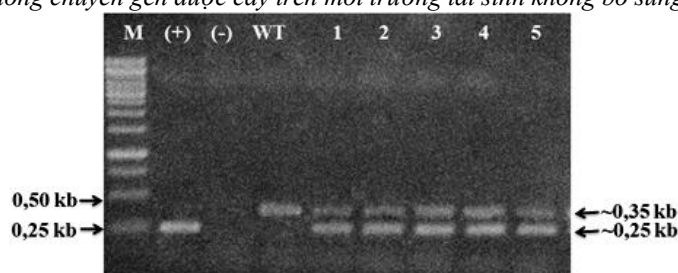


**Hình 2.** Hình ảnh minh họa các bước chuyển gen *ZmDEF1* và tái sinh cây ngô Si Ma Cai chuyển gen. A1: Phôi sau khi nhiễm khuẩn được nuôi trên môi trường đồng nuôi cấy; A2: Phôi nuôi trên môi trường chọn lọc kháng sinh kanamycine 50mg/l, chọn phôi mang gen chuyển lần 1; A3: Phôi nuôi trên môi trường chọn lọc kháng sinh kanamycine 25mg/l, chọn phôi mang gen chuyển lần 2; A4: Phôi nuôi trên môi trường phục hồi mô sẹo; A5: Phôi nuôi trên môi trường tái sinh chồi; A6: Phôi nuôi trên môi trường ra rễ; Ra cây: Cây được trồng ngoài tự nhiên

**Bảng 1.** Kết quả biến nạp cấu trúc *pBetaPhaso-ZmDEF1* phôi ngô non Si Ma Cai

Thí nghiệm và đối chứng	Số phôi	Số phôi sống sót		Số phôi phục hồi	Số phôi tạo chồi	Số chồi tạo thành	Số chồi tạo rễ	Số cây ra bầu đất	Số cây trồng tại vườn
		Môi trường A2	Môi trường A3						
Thí nghiệm	3x 30=90	25	13	12	9	15	8	5	5
ĐC0	30	0	-	-	-	-	-	-	-
ĐC1	30	30	30	30	30	30	30	5	5

(ĐC0: phôi ngô non không chuyển gen được cấy trên môi trường tái sinh có bổ sung kháng sinh chọn lọc; ĐC1: phôi ngô non không chuyển gen được cấy trên môi trường tái sinh không bổ sung kháng sinh chọn lọc)



**Hình 3.** Kết quả điện di sản phẩm PCR xác định sự có mặt của gen chuyển *ZmDEF1* trong các cây ngô chuyển gen thế hệ T0. (1- 5: các cây ngô chuyển gen thế hệ T0; M: thang chuẩn DNA 1kb; (+): sản phẩm PCR vector chuyển gen *ZmDEF1*; (-): sản phẩm PCR từ nước cất; WT: sản phẩm PCR từ DNA cây ngô không chuyển gen)

Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR khuếch đại gen *ZmDEF1* ở hình 3 cho thấy, tất cả 5 cây chuyển gen đều cho kết quả có 2 băng DNA với kích thước khoảng 0,25 kb và 0,35 kb tương ứng với kích thước ước tính cho gen *ZmDEF1* nội tại và gen *ZmDEF1* ngoại lai. Như vậy, có thể khẳng định rằng gen *ZmDEF1* đã được chuyển thành công vào

giống ngô Simacai nhờ *A. tumefaciens*. Hiệu suất chuyển gen của giống ngô Si Ma Cai đến giai đoạn đánh giá là  $5/90 = 5,56\%$ .

#### KẾT LUẬN

Kết quả 3 lần biến nạp gen *ZmDEF1* vào 90 phôi ngô non giống ngô Si Ma Cai đã thu được 15 chồi, có 8 chồi ra rễ và 5 cây trồng trong nhà lưới. Kiểm tra sự có mặt của gen

chuyển *ZmDEF1* trong các cây chuyển gen bằng kỹ thuật PCR thu được cả 5 cây ngô chuyển gen đều dương tính. Hiệu suất chuyển gen là 5,56%. Kết quả nghiên cứu là cơ sở cho việc tiếp tục phân tích để tạo cây ngô chuyển gen có khả năng kháng lại một ngô.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trần Thị Lương, Nguyễn Thị Thu, Nguyễn Thùy Ninh, Nguyễn Đức Thành (2014), “Chuyển gen shrunken 2 (Sh2) mã hóa enzyme ADP-glucose Pyrophosphorylase vào một số dòng ngô bằng phương pháp chuyển gen thông qua *Agrobacterium tumefaciens*”, *Tạp chí Sinh học* 36(1), tr. 99-109.
2. Vi Thị Xuân Thủy, Hồ Mạnh Tường, Lê Văn Sơn, Nguyễn Vũ Thanh Thanh, Chu Hoàng Mậu (2015), “Đặc điểm phân tử của gen defensin I phân lập từ một số mẫu ngô có khả năng kháng một khác nhau”, *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 2(9), tr. 38-43.
3. Ali Q., Ali A., Tariq M., Abbas M. A., Sarwar B., Ahmad M., Awaan M. F., Ahmad S., Nazar Z. A., Akram F., Shahzad A., T. R., Samiullah I. A. Nasir, and T. Husnain (2014), “Gene Action for Various Grain and Fodder Quality Traits in *Zea*

*mays*”, *Journal of Food and Nutr. Research*, 2(10), pp. 704 - 717.

4. Carvalho A. de O., Gomes V. M. (2011), “Plant defensins and defensin-like peptides - biological activities and biotechnological applications”, *Curr. Pharm. Des.*, 17(38), pp. 4270–4293.

5. Edgertom M. D. (2009), “Increasing crop productivity to meet Global needs for feed, food and fuel”, *Plant Physiol*, 149, pp. 7-13.

6. FAOSTAT (2012), <http://faostat.fao.org>

7. Frame B. R., Shou H., Chikwamba R., Zhang Z., Xiang C., Fonger T., Pegg S-E., Li B., Nettleton D., Pei P., Wang K. (2002) “*Agrobacterium*-mediated transformation of maize embryos using a standard binary vector system”, *Plant Physiol.*, 129, pp. 13-22.

8. Liu Y. J., Cheng C. S., Lai S. M., Hsu M. P., Chen C., Lyu P. C. (2006), “Solution structure of the plant defensin VrD1 from mung bean and its possible role in insecticidal activity against bruchids”, *Proteins*, 63, pp. 777–786.

9. Pelegriani B. P., Lay F. T., Murad M. A., Anderson M. A., Franco L. O., (2008). “Novel insights on the mechanism of action of  $\alpha$ -amylase inhibitors from the plant defensin family”, *Proteins*, 73, pp. 719–729.

#### SUMMARY

#### AGROBACTERIUM-MEDIATED *ZmDEF1* GENE TRANSFORMATION INTO SIMACAI LOCAL MAIZE CULTIVAR

Hoàng Thị Huệ Khang<sup>1</sup>, Bui Thị Minh Thủy<sup>1</sup>, Trần Thị Hồng<sup>1</sup>,  
Vi Thị Xuân Thủy<sup>2</sup>, Chu Hoàng Mậu<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>University of Education - TNU; <sup>2</sup>Taybac University

Plant defensins are multifunctional proteins, they can be inhibitors translational, affecting the ion exchange function of the membrane, weaken the microorganisms, enhanced zinc stress resistance, changing the oxidation state of ascorbic acid and especially Inhibit  $\alpha$ -amylase activity of insect gut. This paper presents results of *Agrobacterium*-mediated *ZmDEF1* gene (*defensin I*) transformation isolated from local corn with high resistance into Simacai local maize cultivar. The results of the three times the *ZmDEF1* gene transformations to ninety young corn embryos received fifteen shoots, eight shoots have roots and five transgenic maize plants in the greenhouse. Tested the presence of the *ZmDEF1* transgene in five transgenic plants using PCR, all five transgenic maize plants were positive. Transgenic performance is 5.56%. This result is the basis for further research to create transgenic maize plants that is resistant against maize weevils.

**Keywords:** *Agrobacterium*-mediated transformation, plant defensin, *ZmDEF1* gene,  $\alpha$ -amylase inhibitor, young maize embryo.

Ngày nhận bài: 06/7/2017; Ngày phản biện: 16/7/2017; Ngày duyệt đăng: 31/7/2017

\* Tel: 0913 383289, Email: chuhoangmau@tnu.edu.vn