

Chuyển gen *ZmDEF1* nhờ *Agrobacterium tumefaciens* vào giống thuốc lá (*Nicotiana tabacum* L.) C9-1

Vì Thị Xuân Thủy^{1*}, Bùi Thị Minh Thúy², Hoàng Thị Huệ Khang², Chu Hoàng Mậu²

¹Trường Đại học Tây Bắc

²Trường Đại học Sư phạm, Đại học Thái Nguyên

Ngày nhận bài 10/4/2017; ngày chuyển phản biện 14/4/2017; ngày nhận phản biện 26/5/2017; ngày chấp nhận đăng 5/6/2017

Tóm tắt:

Defensin thực vật là protein đa chức năng, một trong các chức năng quan trọng là ức chế hoạt động của α -amylase từ ruột côn trùng. Dựa trên đặc tính này, nhiều tác giả đã nghiên cứu sử dụng defensin thực vật để bảo vệ cây trồng chống lại một hại hạt trong công nghệ bảo quản sau thu hoạch. Gen *defensin1* (*ZmDEF1*) phân lập từ giống ngô địa phương Mai Sơn (Sơn La) - giống có khả năng kháng một ngô cao được sử dụng làm gen chuyển trong thí nghiệm tạo cây thuốc lá chuyển gen từ giống C9-1. Kết quả cho thấy, biến nạp cấu trúc pBetaPhaso-*ZmDEF1* vào 60 mảnh lá của giống thuốc lá C9-1 trong 3 lần thí nghiệm thu được 56 mảnh sống sót, tạo được 69 chồi, chuyển được 12 cây chuyển gen ra trồng trong bầu đất và có 6 cây trồng tại nhà lưới sinh trưởng, phát triển bình thường, biểu hiện xanh tốt, mập mạp. Kiểm tra sự có mặt của gen chuyển *ZmDEF1* ở các dòng thuốc lá chuyển gen bằng phản ứng PCR thu được 5/6 dòng cây chuyển gen chứa gen chuyển *ZmDEF1*, hiệu suất chuyển gen đạt 8,33%. Kết quả này là cơ sở để tiến hành thí nghiệm chuyển gen *ZmDEF1* ở ngô nhằm tạo các dòng ngô chuyển gen có khả năng kháng một cao.

Từ khóa: Chuyển gen, Defensin, kháng một, ức chế α -amylase, *ZmDEF1*.

Chỉ số phân loại: 4.6

Mở đầu

Thuốc lá (*Nicotiana tabacum* L.) có hệ thống tái sinh tương đối đơn giản và thời gian tái sinh tạo cây khá ngắn nên được sử dụng làm cây mô hình trong các nghiên cứu cơ bản và ứng dụng, đặc biệt được sử dụng nghiên cứu chức năng gen thông qua kỹ thuật chuyển gen.

Defensin thực vật là protein đa chức năng, một trong các chức năng quan trọng là ức chế hoạt động của α -amylase côn trùng [1]. Cấu trúc không gian ba chiều của defensin gồm 3 phiến gấp β và một chuỗi xoắn α . Trong đó giữa nếp gấp β thứ 2 và thứ 3 có vùng Loop 3, vùng này có chức năng quan trọng trong ức chế hoạt động α -amylase của một. Do có sự liên kết giữa Loop 3 với trung tâm hoạt động của α -amylase ở một đã ngăn cản cơ chất tinh bột đi vào nên sự tiêu hóa tinh bột bị ngừng trệ [2]. Sự ức chế này biểu hiện thấp đối với α -amylase của động vật có vú, vì có sự sai khác về độ dài của vùng lặp ở trung tâm hoạt động của α -amylase ở động vật, nên Loop 3 của defensin không liên kết vào được. Trên cơ sở khả năng ức chế α -amylase ở ruột côn trùng của defensin thực vật, nhiều tác giả đã quan tâm nghiên cứu sử dụng defensin này trong việc bảo

vệ cây trồng chống lại một hại. Liu và cs (2006) đã phân lập defensin từ cây đậu xanh và chứng minh được khả năng ức chế α -amylase nên kim hãm sự tiêu hóa tinh bột trong ruột ấu trùng một đậu xanh [3]. Năm 2008, Pelegriani và cs đã nghiên cứu chức năng của defensin trong sự ức chế hoạt động của α -amylase ở ấu trùng một khi phân lập defensin từ cây đậu đũa và chứng minh được sự ức chế đối với α -amylase của một là rất cao [4].

Gen *ZmDEF1* phân lập từ giống ngô địa phương Mai Sơn (Sơn La) - giống có khả năng kháng một ngô cao, được sử dụng để thiết kế vector chuyển gen với mục đích tăng cường khả năng kháng một ở ngô [5]. Trong nghiên cứu này, chúng tôi trình bày kết quả chuyển gen *ZmDEF1* vào cây thuốc lá nhằm đánh giá khả năng hoạt động của vector chuyển gen mang cấu trúc chứa gen *ZmDEF1* làm cơ sở cho các thí nghiệm chuyển gen *ZmDEF1* vào cây ngô nhằm tạo cây ngô chuyển gen kháng một.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Sử dụng giống thuốc lá C9-1, chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* CV58 chứa cấu trúc pBetaPhaso-*ZmDEF1*

*Tác giả liên hệ: Tel: 0983484171; Email: xuanthuy@utb.edu.vn

Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of *ZmDEF1* into tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) cultivar C9-1

Thi Xuan Thuy Vi^{1*}, Thi Minh Thuy Bui²,
Thi Hue Khang Hoang², Hoang Mau Chu²

¹Tay Bac University

²Thai Nguyen University of Education

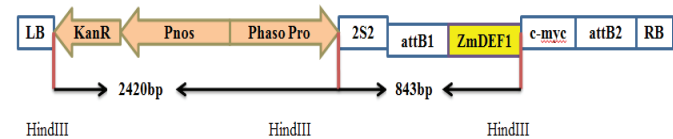
Abstract:

Plant defensins are multifunctional proteins, and one of the important functions is the inhibition of α -amylase activity in insects. Based on this characteristic, many authors have studied and used plant defensins to protect crops against weevils in postharvest preservation. In this study, *ZmDEF1* gene isolated from the local maize Mai Son (Son La) with a high resistance to maize weevils was used as a transgene in the experiment to create transgenic tobacco plants from the cultivar C9-1. Transferring the pBetaPhaso-*ZmDEF1* into 60 leaf pieces of the C9-1 tobacco cultivar three times obtained 56 survival pieces, created 69 shoots, and 12 transgenic crops were transferred to nethouses, including 6 crops with normal growth and development, lush and stout expression. Testing the presence of the *ZmDEF1* transgene in transgenic tobacco lines by PCR obtained 5/6 transgenic plants containing the *ZmDEF1* transgene, and the transgenic efficiency reached 8.33%. This result is the basis for conducting transgenic experiments in maize plants to generate transgenic maize lines with high resistance to weevils.

Keywords: *Defensin, gene transfer, inhibit α -amylase, resistance to weevils, ZmDEF1 gene.*

Classification number: 4.6

(hình 1) mang gen chuyển *ZmDEF1* có nguồn gốc từ cây ngô [6].



Hình 1. Sơ đồ cấu trúc của vector chuyển gen pBetaPhaso-*ZmDEF1* (Phaso Pro: Promoter Phasoline; attB1 và attB2: Các vị trí tái tổ hợp trong phản ứng RB; LB: Bờ trái T-ADN; RB: Bờ phải T-ADN; KanR: Gen kháng kanamycine).

Chuyển gen vào giống thuốc lá C9-1 thông qua *A. tumefaciens* được tiến hành theo phương pháp của Topping (1998) [7]. ADN tổng số từ các mẫu lá non được tách chiết theo phương pháp của Saghai và cộng sự (1984) [8]. Kiểm tra sự có mặt của gen chuyển *ZmDEF1* trong cây chuyển gen bằng PCR với cặp mồi *ZmDEF1F-SalI/ZmDEF1R-HindIII* (bảng 1). Các thí nghiệm được thực hiện tại Phòng thí nghiệm công nghệ tế bào thực vật, Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm, Đại học Thái Nguyên.

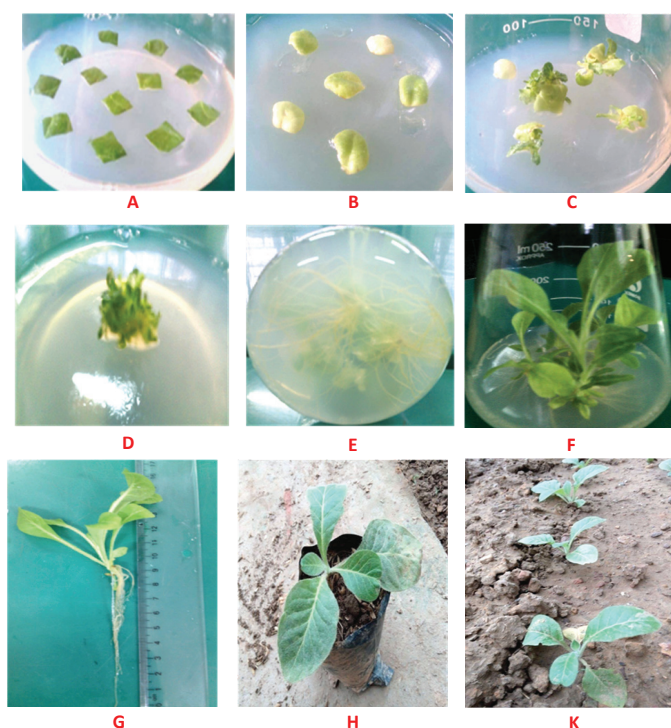
Bảng 1. Trình tự nucleotide của cặp mồi *ZmDEF1F-SalI/ZmDEF1R-HindIII*.

Ký hiệu	Trình tự nucleotide (5'-3')	Sản phẩm (bp)
<i>ZmDEF1F-SalI</i>	ACGC/GTCGACATGGCGCCGTCTCGACGCA	243
<i>ZmDEF1R-HindIII</i>	CCCA/AGCTTGCAGATCTTCTTGACAAGCAC	

Kết quả và thảo luận

Kết quả chuyển gen *ZmDEF1* vào giống thuốc lá C9-1 và tái sinh cây thuốc lá chuyển gen

Các mảnh lá cây thuốc lá giống C9-1 chuẩn bị từ nuôi cấy in vitro được cắt kích thước khoảng 0,5 cm², sau 2 ngày đồng nuôi cấy trong tối trên môi trường MS, dùng để biến nạp gen. Các mảnh lá sau khi ngâm khuẩn *A. tumefaciens* mang gen chuyển *ZmDEF1* trong 30 phút, thấm khô và nuôi tiếp trên môi trường MS. Sau 2 ngày, rửa khuẩn bằng kháng sinh và được chuyển sang môi trường MS có bổ sung kháng sinh và BAP. Sau 2-3 tuần từ các mảnh lá xuất hiện các chồi nhỏ. Các chồi nhỏ được tách từ các mảnh lá và cấy lên môi trường MS bổ sung kháng sinh và BAP để kéo dài chồi. Sau 1-2 tuần, các chồi này được cấy chuyển sang môi trường MS bổ sung kháng sinh và IBA để cho ra rễ. Các cây thuốc lá sau khi ra rễ trên môi trường có kháng sinh chọn lọc được chuyển trực tiếp ra bầu chứa giá thể ra cây (hình 2).



Hình 2. Kết quả chuyển gen *ZmDEF1* tái sinh cây thuốc lá C9-1 chuyển gen (A: Mảnh lá sau khi rửa khuẩn được cấy lên môi trường chọn lọc; B, C: Các cụm chồi được tạo thành sau 2 tuần được cấy trong môi trường chọn lọc; D: Cụm chồi được hình thành sau 4 tuần; E, F: Cây thuốc lá chuyển gen trong môi trường ra rễ; G: Kích thước cây thuốc lá chuyển gen khi ra bầu; H: Cây thuốc lá chuyển gen trồng trong bầu đất; K: Cây thuốc lá chuyển gen trồng trong vườn cây).

Tiến hành 3 lần biến nạp cấu trúc chứa gen chuyển *ZmDEF1* vào các mảnh lá thuốc lá với 20 mảnh lá/lần, sau các giai đoạn nuôi cấy và chọn lọc, kết quả được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2. Kết quả biến nạp cấu trúc chứa gen *ZmDEF1* vào mảnh lá thuốc lá.

	Số mảnh lá biến nạp	Số mảnh lá sống sót	Số cụm chồi tạo thành	Số chồi tạo thành và sống sót	Số cây ra rễ	Số dòng cây ra bầu đất	Số dòng cây trồng tại nhà lưới
Thí nghiệm	20 x 3 = 60	56	53	69	57	12	6
ĐC0	30	0	-	-	-	-	-
ĐC1	30	30	48	65	59	10	10

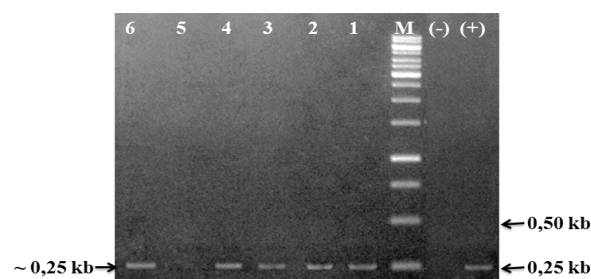
Ghi chú: ĐC0: Mảnh lá thuốc lá không chuyển gen được cấy trên môi trường tái sinh có bổ sung kháng sinh; ĐC1: Mảnh lá thuốc lá không chuyển gen được cấy trên môi trường tái sinh không bổ sung kháng sinh.

Kết quả ở bảng 2 cho thấy, với 60 mảnh lá cây thuốc lá C9-1 biến nạp sử dụng thí nghiệm có 56 mảnh sống sót, tạo ra 69 chồi và thu được 12 dòng cây chuyển gen trồng bầu đất và 6 dòng cây trồng tại nhà lưới với biểu hiện xanh tốt, mập mạp. Đồng thời trồng 10 dòng cây thuốc lá không chuyển gen để làm đối chứng.

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

AND tổng số được tách từ các mẫu lá non của 6 dòng cây thuốc lá chuyển gen ở thế hệ T0 trồng tại nhà lưới sau 3-4 tuần ra cây, kiểm tra sản phẩm ADN bằng điện di cho kết quả ADN đảm bảo chất lượng cho phản ứng PCR.

Tiến hành kiểm tra sự có mặt của gen chuyển *ZmDEF1* bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu *ZmDEF1F-Sall/ZmDEF1R-HindIII*, kết quả được thể hiện ở hình 3. Kết quả hình 3 cho thấy, làn điện di sản phẩm PCR từ các cây thuốc lá không chuyển gen (đối chứng âm) không xuất hiện băng ADN, như vậy cây thuốc lá không mang gen *ZmDEF1*. Làn điện di dòng cây chuyển gen số 5 âm tính với phản ứng PCR và 5 dòng cây thuốc lá chuyển gen còn lại (dòng cây 1, 2, 3, 4 và 6) dương tính với phản ứng PCR, với một băng ADN có kích thước khoảng 0,25 kb tương ứng với kích thước ở mẫu đối chứng dương (PCR từ vector chuyển gen pBetaPhaso-*ZmDEF1*). Như vậy có thể khẳng định, cấu trúc pBetaPhaso-*ZmDEF1* đã được chuyển thành công vào cây thuốc lá giống C9-1, với hiệu suất chuyển gen đạt $5/60 = 8,33\%$.



Hình 3. Kết quả điện di kiểm tra sản phẩm PCR xác định sự có mặt của gen chuyển *ZmDEF1* trong các dòng cây thuốc lá chuyển gen (1-6: Các dòng cây thuốc lá chuyển gen; (+): PCR từ vector chuyển gen pBetaPhaso-*ZmDEF1*; (-): Cây thuốc lá không chuyển gen; M: Thang ADN 1 kb).

Kết luận

Biến nạp cấu trúc pBetaPhaso-*ZmDEF1* vào 60 mảnh lá của giống thuốc lá C9-1 trong 3 lần thí nghiệm thu được 56 mảnh sống sót, tạo được 69 chồi, chuyển được 12 cây chuyển gen ra trồng trong bầu đất và có 6 cây trồng tại nhà lưới sinh trưởng, phát triển bình thường, biểu hiện xanh tốt, mập mạp. Kiểm tra sự có mặt của gen chuyển *ZmDEF1*

ở các dòng thuốc lá chuyển gen bằng phản ứng PCR, thu được 5/6 dòng cây chuyển gen chứa gen chuyển *ZmDEF1*, hiệu suất chuyển gen đạt 8,33%.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] C.F.J. Olilla, A. Rocher, E. Mendez (1990), "γ-Purothionins: Amino acid sequence of two polypeptides of a new family of thionins from wheat endosperm", *FEBS Lett*, **270**(1-2), pp.191-194.
- [2] K.F. Lin, T.R. Lee, P.H. Tsai, M.P. Hsu, C.S. Chen, P.C. Lyu (2007), "Structure-based protein engineering for alpha-amylase inhibitory activity of plant defensin", *Proteins*, **68**, pp.530-540.
- [3] Y.J. Liu, C.S. Cheng, S.M. Lai, M.P. Hsu, C.S. Chen, P.C. Lyu (2006), "Solution structure of the plant defensin *VrD1* from mung bean and its possible role in insecticidal activity against bruchids", *Proteins*, **63**(4), pp.777-786.
- [4] P.B. Pelegriani, F.T. Lay, A.M. Murad, M.A. Anderson, O.L. Franco (2008), "Novel insights on the mechanism of action of α-amylase inhibitors from the plant defensin family", *Proteins*, **73**, pp.719-729.
- [5] Vì Thị Xuân Thủy, Hồ Mạnh Tường, Lê Văn Sơn, Nguyễn Vũ Thanh Thanh, Chu Hoàng Mậu (2015), "Đặc điểm phân tử của gen *defensin1* 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.
- [6] Thi Xuan Thuy Vi, Hoang Duc Le, Vu Thanh Thanh Nguyen, Van Son Le, Hoang Mau Chu (2017), "Expression of the *ZmDEF1* gene and α-amylase inhibitory activity of recombinant defensin against maize weevils", *Turk J. Biol.*, **41**, pp.98-104.
- [7] J.F. Topping (1998), "Tobacco transformation", *Methods of Mol. Biol.*, **81**, pp.365-372.
- [8] M.M.A. Saghai, K.M. Soliman, R.A. Jorgensen, R.W. Allard (1984), "Ribosomal DNA spacer - length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics", *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **81**, pp.8014-8018.