

Nghiên cứu hoàn thiện quy trình tái sinh cây và thiết kế vector mang gen *AGPopt* tổng hợp nhân tạo để chuyển vào cây sắn (*Manihot esculenta* Crantz)

Đỗ Hải Lan^{1,2}, Lê Văn Sơn¹, Lê Trần Bình^{1*}

¹Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

²Trường Đại học Tây Bắc

Ngày nhận bài 5/4/2017; ngày chuyển phản biện 7/4/2017; ngày nhận phản biện 3/5/2017; ngày chấp nhận đăng 12/5/2017

Tóm tắt:

Sắn (*Manihot esculenta* Crantz) là cây có giá trị trong an ninh lương thực và công nghiệp. Cải tạo giống sắn bằng công nghệ sinh học có ý nghĩa lớn đối với khoa học và thực tiễn. Quy trình chuyển gen nhằm vào *AGPopt* tổng hợp nhân tạo để gia tăng hàm lượng tinh bột là mục tiêu lâu dài của nghiên cứu này. Quy trình tái sinh cây sắn thông qua phôi soma từ đỉnh chồi và thùy lá non của 2 giống sắn KM140 và KM94 đã được tối ưu trên môi trường MS bổ sung picloram 12 mg/l và tái sinh trên môi trường BAP 0,3 mg/l. Phôi soma sơ cấp của sắn được lựa chọn để chuyển gen. Cấu trúc gen *AGPopt* được tổng hợp nhân tạo dựa trên protein glgC của vi khuẩn *E. coli* K12 (mã số AKD93525.1), thêm đột biến G336D, tối ưu hoá mã di truyền cho phù hợp với thực vật và gắn chuỗi peptide tín hiệu (gồm 57 amino acid), đuôi c-myc (11 amino acid) và trình tự KDEL (4 amino acid). Gen *AGPopt* tổng hợp nhân tạo đã được thiết kế hoàn chỉnh vào vector pBI121 và đã được đánh giá trên cây thuốc lá mô hình. Kết quả tạo 32 dòng cây thuốc lá chuyển gen được kiểm tra dương tính bằng PCR, đều mang gen *AGPopt* bằng lai Southern, tạo được protein AGPase bằng Western blot, có hoạt tính AGPase trong lá tăng từ 121 (L6) đến 153% (L7) và có hàm lượng tinh bột tăng từ 140,05 (L2) đến 168,99% (L7) so với đối chứng. Cấu trúc gen *AGPopt* này đã được sử dụng chuyển vào cây sắn KM94 thông qua phôi soma nhờ *A. tumefaciens*, bước đầu thu được 6 dòng cây hoàn chỉnh, trong đó 5/6 dòng được xác định có mặt gen *AGPopt*. Các dòng sắn chuyển gen này đang được đánh giá tiếp tục.

Từ khóa: *AGPopt* tổng hợp nhân tạo, cây sắn (*Manihot esculenta* Crantz), chuyển gen, phôi soma, tăng sinh tinh bột.

Chỉ số phân loại: 1.6

Đặt vấn đề

Cây sắn (*Manihot esculenta* Crantz) được trồng ở châu Phi, châu Á và châu Mỹ, đáp ứng nhu cầu lương thực cho 800 triệu người. Củ sắn có hàm lượng chất khô chiếm 20%, trong đó 80% là tinh bột, được sử dụng chủ yếu làm lương thực, thức ăn chăn nuôi, tinh bột công nghiệp, nguyên liệu cho sản xuất đường, nhiên liệu sinh học [1]. Ở nước ta sản phẩm từ sắn đã trở thành mặt hàng xuất khẩu có giá trị, đạt kim ngạch 1,32 tỷ USD trong năm 2015. Tuy nhiên, năng suất sắn của Việt Nam chỉ đạt 19,15 tấn/ha, ở mức trung bình của thế giới [2]. Để phát triển cây sắn bền vững, cần thiết phải cải tạo giống sắn để không chỉ thu được lợi nhuận cao mà còn duy trì được độ phì nhiêu của đất.

Hiện nay, trong công tác chọn tạo giống cây trồng, công nghệ gen đã trở thành công cụ hiệu quả để cải biến di truyền, nhất là những cây được nhân giống vô tính là chủ yếu như cây sắn. Trên thế giới, nghiên cứu tạo cây

sắn chuyển gen đã được bắt đầu từ 25 năm trước và đến nay đã có những thành tựu, đặc biệt trong hướng cải tiến chất lượng củ như giảm hàm lượng cyanogen, giảm tỷ lệ amylose trong tinh bột, tăng hàm lượng protein, β -caroten, sắt, vitamin, tinh bột... Việc ứng dụng công nghệ chuyển gen nhằm tác động vào quá trình tổng hợp/thủy phân tinh bột để tăng khả năng tích lũy tinh bột ở cơ quan dự trữ, hướng đến nâng cao năng suất cây sắn là mục tiêu dài hạn của hướng nghiên cứu này.

ADP-glucose pyrophosphorylase (AGPase) là enzyme điều hoà quá trình tổng hợp tinh bột ở bước chuyển glucose-1-phosphate thành ADP-glucose, nguyên liệu để tạo thành tinh bột [3]. Trong quá trình nghiên cứu, người ta đã phát hiện ra AGPase của gen *glgC* ở vi khuẩn *E. coli* có hoạt tính cao hơn hàng trăm lần so với ở thực vật [4]. Khi AGPase *E. coli* mang đột biến điểm G336D thay thế glycine ở vị trí 336 bằng axit aspartic có thể hoạt động hiệu quả mà không cần chất hoạt hóa fructose-1,6-bis

*Tác giả liên hệ: Email: le-tran.binh@usth.edu.vn

Study on completing a regeneration system and constructing a synthetic *AGPopt* vector for transformation into cassava (*Manihot esculenta* Crantz)

Hai Lan Do^{1,2}, Van Son Le¹, Tran Binh Le^{1*}

¹Institute of Biotechnology, VAST

²Tay Bac University

Received 5 April 2017; accepted 12 May 2017

Abstract:

Cassava is a high value crop for food security and industry. Improving cassava using biotechnology is providing important scientific and practical values. The longterm objective of this study is to create *AGPopt* transgenic cassava plants for enhancing the starch synthesis. A plant regeneration protocol of the KM140 and KM94 cassava varieties via somatic embryos from shoots and young leaf lobes was optimized on MS supplemented with 12 mg/l picloram for induction of somatic embryogenesis, and germinated on MS supplemented with 0.3 mg/l BAP. The *AGPopt* gene is synthesized using data from glgC protein of *E. coli* K12 (code AKD93525.1) with 1527 bps, added with the G336D mutation, their genetic codes optimized in compliance with plants, the 5' head attached with the 171 bps fragment encoding for the signal peptide (57 amino acids), the 3' end attached the c-myc (11 amino acids), and the KDEL (4 amino acids) sequence. The synthetic *AGPopt* has been constructed into the pBI121 vector for transformation. Using tobacco as the model plant, the transformation of *AGPopt* vector has created 32 transgenic tobacco lines which are proved to be positive by PCR; also positive by Southern blot; positive for AGPase protein expression by Western blot; increasing leaf AGPase activity (from 121 to 153%), and also starch content (from 140.05 to 168.99%). This has successfully proved that the *AGPopt* vector has been used for transformation into KM94 cassava via somatic embryos and resulted in 6 plant lines, 5 of which have been proved to be positive for the *AGPopt* gene. Further analyses of the transgenic cassava lines have been implemented.

Keywords: Cassava (*Manihot esculenta* Crantz), enhancing starch synthesis, genetic transformation, somatic embryo, synthetic *AGPopt*.

Classification number: 1.6

phosphate, có ái lực cao hơn với cơ chất (ATP và Glucose-1-phosphate) và giảm ái lực với chất ức chế AMP [5]. Vì vậy, việc hoàn thiện quy trình nuôi cấy mô tái sinh cây sắn và tổng hợp gen nhân tạo *AGPopt* mã hóa AGPase dựa trên gen AGPase ở vi khuẩn và mang đột biến mong muốn đóng vai trò vô cùng quan trọng phục vụ việc chuyển gen *AGPopt* vào cây sắn, góp phần tạo tiền đề cho cải biến năng suất và chất lượng một số giống sắn đang được trồng phổ biến ở nước ta.

Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Giống cây thuốc lá K326 do Viện Kinh tế kỹ thuật thuốc lá (Tổng công ty Thuốc lá Thăng Long) cung cấp, được sử dụng để biểu hiện protein enzyme tái tổ hợp AGPase.

Hai giống sắn KM94 và KM140 có nguồn gốc từ Trung tâm Tài nguyên thực vật (Viện Khoa học nông nghiệp Việt Nam) được sử dụng làm vật liệu cho tái sinh cây và tạo cây sắn chuyển gen.

Các vector pBI121, pUCIDT-AMP và các chủng vi khuẩn *E. coli* DH5α, *A. tumefaciens* CV58/pGV2260, EHA105 và LBA4404 được lưu giữ tại Phòng Công nghệ tế bào thực vật (Viện Công nghệ sinh học). Gen nhân tạo *AGPopt* được nhóm nghiên cứu đề tài thiết kế và đặt tổng hợp tại hãng Integrated DNA Technologies (Mỹ).

Phương pháp nghiên cứu

Phương pháp nuôi cấy mô và tái sinh cây sắn:

Cây sắn 12-14 ngày tuổi, hình thành từ chồi ngủ của mẫu cây trên môi trường MS, được sử dụng làm vật liệu cho nuôi cấy mô, tái sinh cây và chuyển gen.

Các loại vật liệu đỉnh chồi, cuống lá, đoạn thân non mang chồi ngủ, đoạn thân non không mang chồi ngủ (dài 1,5 cm) và thùy lá non (kích thước 1-2 mm), thùy lá trưởng thành (2×2 mm) được nuôi cấy tạo phôi soma và kích thích phôi nảy mầm trên môi trường MS theo phương pháp được mô tả bởi [6] và [7].

Tổng hợp gen nhân tạo AGPopt mã hóa AGPase và thiết kế vector chuyển gen mang gen AGPopt:

Dựa trên cấu trúc của protein glgC (mã số AKD93525.1) của vi khuẩn *E. coli* K12 đã được công bố trên GenBank, suy diễn thành trình tự gen có mã bộ ba phù hợp biểu hiện trong hệ thống thực vật và thêm đột biến tại vị trí G336D. Bổ sung thêm trình tự protein tín hiệu vào đầu 5' và được gắn với đuôi c-myc và KDEL vào đầu 3'. Gen mã hóa AGPase nhân tạo, ký hiệu là *AGPopt* được đặt

tổng hợp tại hãng Integrated DNA Technologies (Mỹ) và được nhân dòng trong vector pUCIDT-AMP.

Dùng vector pBI121 thay gen *gus* bằng gen *AGPopt*. Biến nạp vector tái tổ hợp vào *A. tumefaciens* bằng phương pháp xung điện.

Phương pháp chuyển gen và đánh giá gen chuyển ở cây thuốc lá và cây sắn:

Chuyển gen *AGPopt* vào cây thuốc lá mô hình được tiến hành theo thường quy của phòng thí nghiệm. Các dòng thuốc lá chuyển gen được phân tích bằng kỹ thuật PCR với cặp mồi đặc hiệu G336F/G336KDEL R, kỹ thuật lai Southern, kỹ thuật lai Western. Tiếp theo các dòng dương tính trên được phân tích cây chuyển gen bằng phương pháp hóa sinh xác định hàm lượng tinh bột trong lá; xác định hoạt tính của enzyme AGPase bằng phương pháp quang phổ thông qua đo hấp thụ tại bước sóng 340 nm của NADPH theo phương pháp của Konstantin [8].

Đối với cây sắn, phôi soma được sử dụng để chuyển

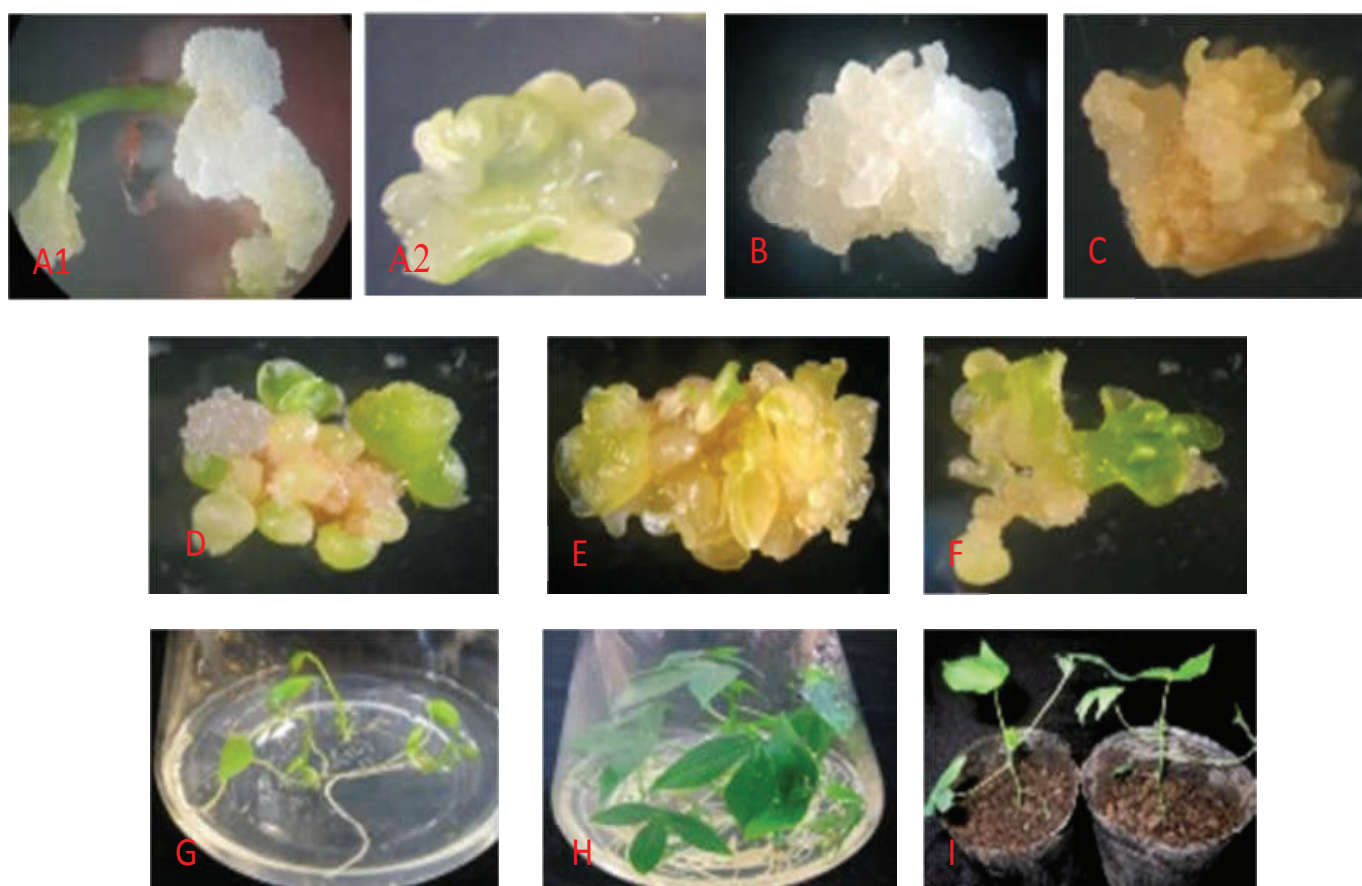
gen thông qua lây nhiễm với huyền phù vi khuẩn bằng phương pháp lắc (50 v/p) và siêu âm. Sự hiện diện của gen chuyển trong các dòng sản tái sinh được xác định thông qua PCR.

Các số liệu được xử lý bằng phần mềm IRRISTAT. Phân tích trình tự nucleotide của gen và trình tự amino acid của protein bằng công cụ Clustal Omega được phát triển bởi EMBL-EBI (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) và phần mềm BioEdit.

Kết quả

Kết quả xây dựng quy trình nuôi cấy mô và tái sinh cây sắn phục vụ chuyển gen

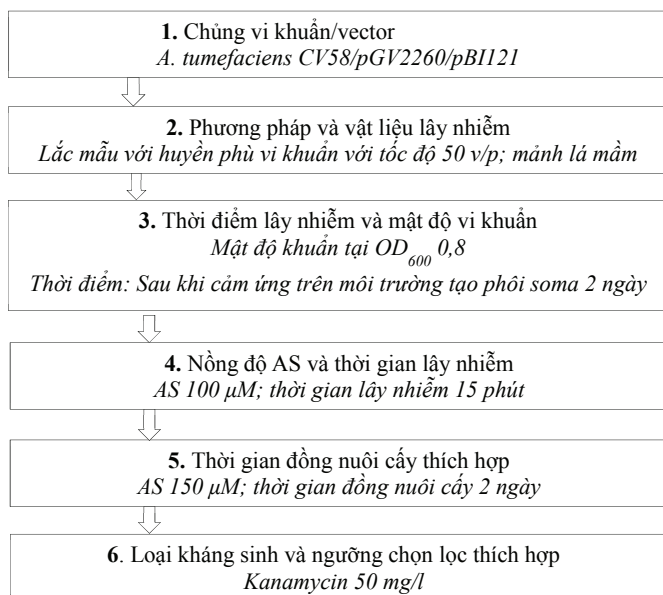
Với nguyên liệu ban đầu là đỉnh chồi và thủy lá non thông qua 3 bước gồm cảm ứng tạo phôi soma trên môi trường MS chứa 12 mg/l picloram, sau đó cho phôi soma nảy mầm trên môi trường MS chứa 0,3 mg/l BAP và tạo rễ trên môi trường không có chất điều hòa sinh trưởng (hình 1).



Hình 1. Tái sinh cây sắn qua các giai đoạn khác nhau. A1 - Mô sẹo phát sinh từ đỉnh chồi; A2 - Mô sẹo phát sinh từ lá non; B, C - Mô sẹo đang phân hoá phôi; D, E, F - Phôi soma đang nảy mầm; G - Phôi soma tái sinh thành cây con; H - Cây trên môi trường ra rễ; I - Cây trồng trên bầu đất.

Kết quả tối ưu hóa quy trình chuyển gen vào cây sắn

Hình 2 mô tả quy trình chuyển gen vào cây sắn thông qua phôi soma và vi khuẩn *A. tumefaciens* mang gen đích.



Hình 2. Sơ đồ chuyển gen vào cây sắn thông qua *A. tumefaciens*.

Kết quả thiết kế vector AGPopt mang gen mã hóa AGPase

Tổng hợp gen AGPopt nhân tạo:

Dựa trên cấu trúc của protein glgC (mã số AKD93525.1) của vi khuẩn *E. coli* K12 đã được công bố trên GenBank, trình tự DNA suy diễn đã được tạo ra và đồng thời các bộ ba mã hoá acid amin đã được tối ưu phù hợp biểu hiện trong thực vật. Hơn nữa, trình tự này đã được đột biến để vị trí amino acid 336 glycine (G) được thay thế bởi aspartic acid (D) - hình 3. Trình tự nucleotide của gen đã tối ưu được đặt tên là AGPopt.

glgC GGTAGCCACGGGATGACCTTAACCTCACTGGTTTCCGGGCGTTGTGTGATCTCCGGTTCG 1029
glgC .G..S..H..G..M..T..L..N..S..L..V..S..G..G..C..V..I..S..G..S. 363

AGPopt GGAAGTCATGGCATGACATTGAATTCCTTGTGACGATGGTTCGCTGATATCCGGATCA1200
AGPopt .G..S..H..G..M..T..L..N..S..L..V..S..D..G..C..V..I..S..G..S. 420

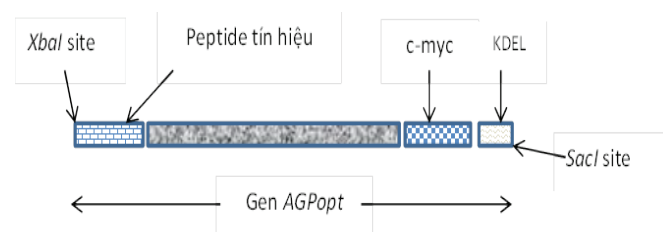
Hình 3. Vị trí đột biến 336 của gen AGPopt nhân tạo.

Khi so sánh trình tự nucleotide của 2 gen, chỉ có 63% đồng nhất giữa trình tự gen tổng hợp AGPase với gen glgC ở *E. coli*. Sự khác biệt với *E. coli* xuất phát từ sự không đồng nhất về bộ ba mã hóa giữa sinh vật nhân sơ và sinh vật nhân thực và tính thoái hoá của mã di truyền trong đó

một amino acid có thể được mã hóa bởi nhiều bộ ba mã hóa khác nhau.

Để phục vụ cho chuyển gen vào cây trồng, ngoài đột biến G336D gen AGPopt cần phải chứa thêm một số cấu trúc phù hợp cho biểu hiện và phân tích biểu hiện trong thực vật bao gồm: Peptide tín hiệu dẫn gồm 57 amino acid gắn vào đầu 5', trình tự nhận biết (c-myc) gồm 11 amino acid và peptide ở đầu 3' giúp cho protein vận chuyển trong quá trình tổng hợp (KDEL).

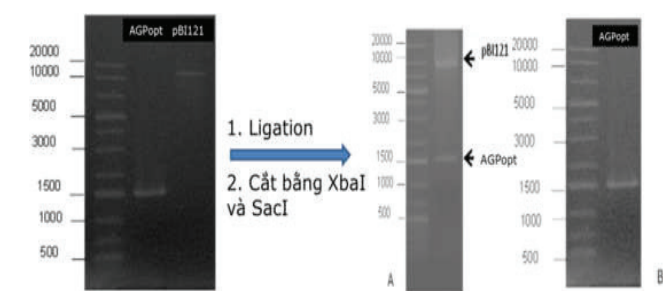
Gen AGPopt sau khi thiết kế có kích thước 1527 bp (hình 4) được tổng hợp nhân tạo, được nhân dòng trong vector pUCIDT-AMP tại hãng Integrated DNA Technologies (Mỹ).



Hình 4. Sơ đồ cấu trúc gen AGPopt tổng hợp nhân tạo.

Thiết kế vector chuyển gen chứa AGPopt tổng hợp nhân tạo:

Dựa vào vector chuyển gen pBI121 để tạo ra vector chuyển gen pBI121/AGPopt bằng cách thay thế gen gus bởi gen AGPopt. Kết quả thực nghiệm trên hình 5 chứng minh vector chuyển gen chứa AGPopt đã được thiết kế thành công.



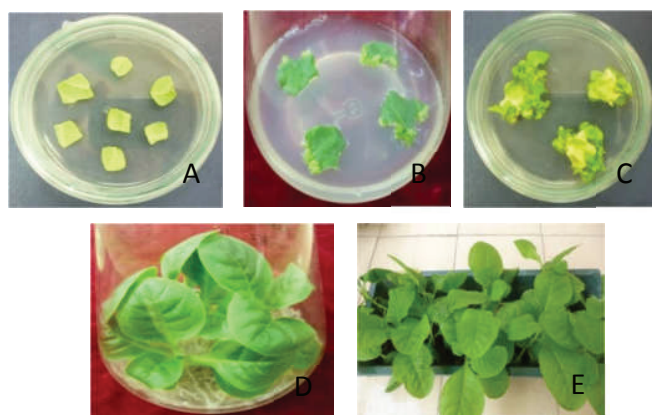
Hình 5. Kết quả điện di sản phẩm PCR của quá trình tổng hợp vector pBI121/AGPopt. Vector này được cắt kiểm tra bằng cặp enzyme giới hạn XbaI và SacI.

Đánh giá hoạt động của vector chuyển gen mang AGPopt ở cây thuốc lá mô hình

Bảng 1 và hình 6 trình bày hiệu quả chuyển gen vào cây thuốc lá với hiệu quả khá cao, tổng số thu được 39 dòng thuốc lá T0 để phân tích tiếp.

Bảng 1. Hiệu quả chuyển gen *AGPopt* vào cây thuốc lá K326.

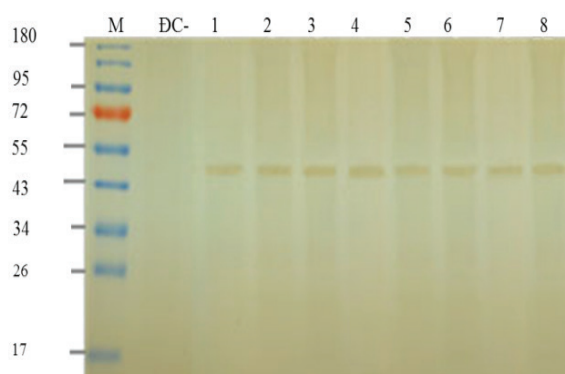
	Số mảnh lá lây nhiễm	Số mảnh lá tạo mô sẹo	Số chồi được tạo thành	Số chồi tạo thành rễ
Lần 1	100	82	17	10
Lần 2	100	87	18	13
Lần 3	100	79	23	16
Tổng	300	248	58	39



Hình 6. Chuyển vi khuẩn *A. tumefaciens* mang vector *pBI121/AGPopt* vào cây thuốc lá K326. A- Mảnh mô thuốc lá K326 được biến nạp với *A. tumefaciens/pBI121/AGPopt*; B, C - Tạo đa chồi trên môi trường chọn lọc; D - Tạo cây hoàn chỉnh; E - Ra cây.

Kết quả đánh giá khả năng biểu hiện của gen *AGPopt* trong cây thuốc lá:

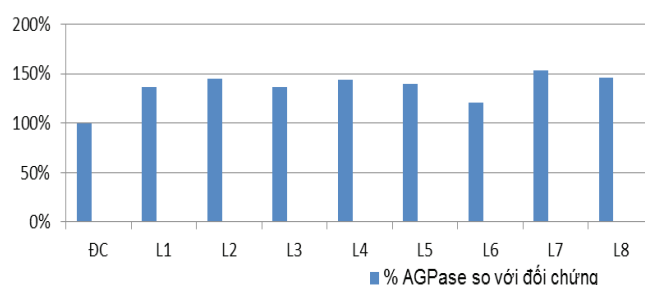
Kết quả lai Western cho phép khẳng định gen *AGPopt* đã hoạt động và protein tái tổ hợp AGPase đã được biểu hiện trong 8 dòng thuốc lá chuyển gen (hình 7).



Hình 7. Kết quả lai Western kiểm tra sự biểu hiện của gen *AGPopt* trong các dòng thuốc lá chuyển gen K326/*pBI121/AGPopt*. ĐC-: Đối chứng âm cây không chuyển gen; M: Marker protein (Thermo Scientific); 1-8: Các dòng thuốc lá K326 chuyển gen *AGPopt*.

Đánh giá sự biểu hiện của gen *AGPopt* qua hoạt tính của AGPase:

Kết quả (hình 8) cho thấy các dòng thuốc lá chuyển gen *AGPopt* phân tích đều có hoạt tính AGPase trong lá tăng so với đối chứng từ 121-153%. Trong 8 dòng thuốc lá chuyển gen phân tích (L1-L8), dòng L7 có hoạt tính AGPase cao nhất (153% so với đối chứng), L2, L3, L8 có độ tăng hoạt tính AGPase so với đối chứng tương đương nhau (144-145%), L1 và L3 đều tăng 137% so với đối chứng, L6 tăng ít nhất (121%).



Hình 8. Hoạt tính enzyme AGPase trong lá các dòng thuốc lá chuyển gen *AGPopt* so với dòng đối chứng không chuyển gen. ĐC: Cây thuốc lá K326 không chuyển gen; L1-L8: các dòng thuốc lá chuyển gen *AGPopt*. Đơn vị tính: % (so với đối chứng).

Hàm lượng tinh bột trong cây thuốc lá chuyển gen *AGPopt*:

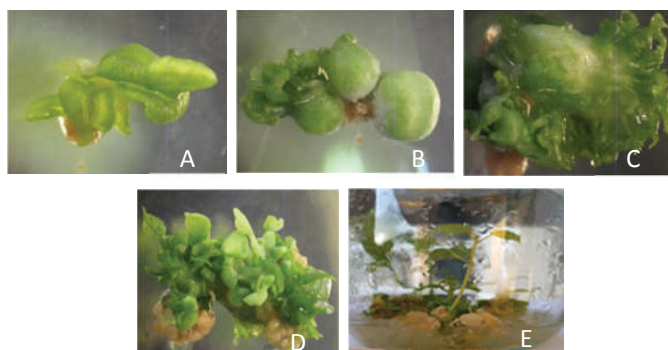
Cả 8 dòng K326/*AGPopt* có hàm lượng tinh bột cao hơn cây đối chứng (bảng 2), trong đó L4, L7 thuộc nhóm có hàm lượng cao nhất (223,94 mg/g và 228,34 mg/g), tăng 165,74-168,99% so với đối chứng, dòng L2 có hàm lượng 189,24 mg/g, tăng so với đối chứng thấp nhất (140,05%).

Bảng 2. Hàm lượng tinh bột trong lá của cây thuốc lá K326/*pBI121/AGPopt* (mg/g khối lượng tươi).

Các dòng thuốc lá	Hàm lượng tinh bột (mg/g)	% so với đối chứng
ĐC	135,12	100
L1	204,16	151,10
L2	189,24	140,05
L3	211,62	156,62
L4	223,94	165,74
L5	199,15	147,39
L6	200,45	148,35
L7	228,34	168,99
L8	210,23	155,59

Chuyển gen *AGPopt* tổng hợp nhân tạo vào cây sắn

Hình 9 minh họa kết quả chuyển gen *AGPopt* vào cây sắn KM94 theo quy trình chuyển gen mô tả ở phần trên.



Hình 9. Tái sinh cây từ phôi soma của giống sắn KM94 chuyển gen nhân tạo *AGPopt* mã hóa AGPase. A - Phôi soma sơ cấp; B - Phôi thứ cấp hình thành từ phôi chuyển gen sau 30 ngày nuôi cấy trong môi trường CIM; C - Phôi chuyển gen 60 ngày trong môi trường tái sinh; D - Chồi được tái sinh từ phôi thứ cấp; E - Rễ được tái sinh từ phôi thứ cấp.

Với 1018 mẫu qua 6 lô thí nghiệm, số mẫu tạo phôi thứ cấp là 69, chiếm tỷ lệ 6,78%; trong số đó chỉ có 4 mẫu tạo chồi với tổng số chồi thu được là 6; tất cả 6 chồi đều tạo rễ. Kết quả thu được 6 dòng cây hoàn chỉnh (bảng 3).

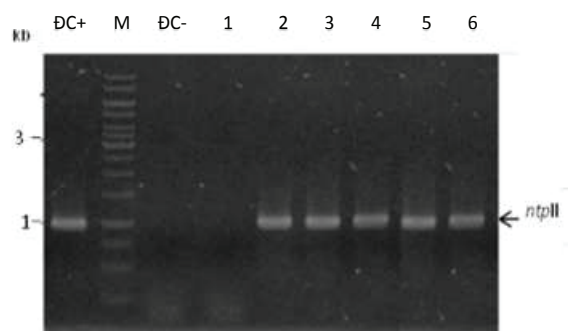
Bảng 3. Khả năng tạo chồi và ra rễ của các mẫu sắn KM94/*AGPopt*.

Lô thí nghiệm	Số lượng mảnh mô lấy nhiễm	Số mảnh mô tạo phôi thứ cấp	Số mảnh mô tạo chồi	Số chồi hình thành	Tỷ lệ số chồi ra rễ/tổng số chồi	Số cây hoàn chỉnh	Số cây dương tính PCR
1	180	14	1	2	100%	2	2
2	141	11	0	0	0	0	0
3	175	10	1	2	100%	2	1
4	163	10	0	0	0	0	0
5	155	13	1	1	100%	1	1
6	204	11	1	1	100%	1	1

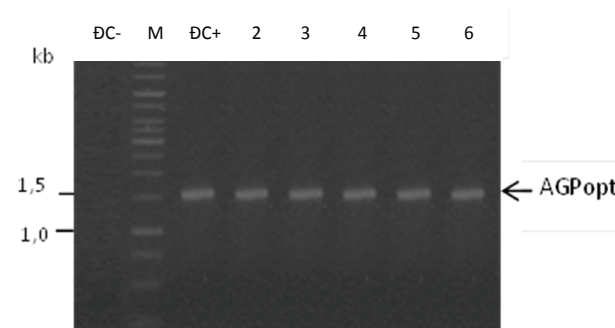
Kiểm tra các dòng sắn chuyển gen bằng PCR:

Để kiểm tra sự có mặt và hoạt động của cấu trúc gen chuyển, phản ứng PCR nhân gen kháng kanamycin sử dụng cặp mồi *nptII*_F/R được thực hiện. Kết quả, với các cây sắn kiểm tra, 5/6 cây sắn chuyển gen đã xuất hiện băng có kích thước gần 1 kb là kích thước của gen *nptII* (hình 10A). Dựa vào kết quả này, 5 cây dương tính với cặp mồi *nptII*_F/R (từ 2-6) được kiểm tra sự có mặt của

gen *AGPopt* bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu G336F/G336KDEL R (hình 10B).



Hình 10A. Kết quả điện di sản phẩm PCR nhân gen mã hóa *nptII* từ các cây sắn KM94 chuyển gen. M: Thang DNA chuẩn 1 kb; (ĐC+): Sản phẩm PCR nhân gen mã hóa *nptII* từ vector pBI121+AGPase; (ĐC-): Sản phẩm PCR nhân gen mã hóa *nptII* từ cây sắn KM94 không chuyển gen; 1-6: Sản phẩm PCR nhân gen mã hóa *nptII* từ các cây sắn KM94 chuyển gen (KM94/pBI121/AGPopt/1-6).



Hình 10B. Kết quả điện di sản phẩm PCR các cây sắn KM94 chuyển gen *AGPopt* với cặp mồi đặc hiệu G336F/G336KDEL R. M: Thang DNA chuẩn 1 kb; (ĐC+): vector pBI121/AGPopt; (ĐC-): DNA tổng số từ cây sắn KM94 không chuyển gen; 2-6: Các cây sắn KM94 chuyển gen *AGPopt* 2-6 (dương tính với *nptII*) dương tính với cặp mồi đặc hiệu.

Bàn luận

Đỉnh chồi và lá non là 2 loại vật liệu khởi đầu được tối ưu tách từ cây *in vitro* 10-14 ngày tuổi, đây là 2 loại mô có khả năng phân chia mạnh nhưng chưa phân hóa sâu sắc, vì vậy, khả năng phản phân hóa quay trở lại trạng thái ban đầu rất cao, dễ dàng chuyển hóa thành phôi soma khi gặp môi trường phù hợp [9-12]. Đôi khi phôi hữu tính cũng được sử dụng làm vật liệu tái sinh. Hiệu quả trong phát sinh phôi soma và tái sinh cây theo quy trình này tạo tiền đề cho các nghiên cứu ứng dụng trong nhân giống và chuyển gen vào cây sắn, phù hợp với các nghiên cứu trước

đây [9, 10] đã xác định rằng phôi soma có thể được cảm ứng và cây được tạo ra từ mẫu lá chưa hoàn chỉnh trên môi trường Murashige và Skoog [13] bổ sung auxin. Cây tái sinh theo cách này là dạng vô tính của vật liệu gốc trường thành, giữ nguyên tất cả các tính trạng của các tế bào mầm có được.

Các báo cáo ban đầu về cây biến đổi gen xác nhận rằng, cây chuyển gen có thể được tạo ra bởi gây nhiễm *A. tumefaciens* vào mảnh lá mầm [6] hoặc súng bắn gen vào các phôi soma đã hình thành lá mầm [14, 15]. Hiệu quả chuyển gen vào cây trồng nói chung và cây sắn nói riêng phụ thuộc vào rất nhiều yếu tố, như kiểu di truyền của cây, độ khỏe của mẫu, loại vector, chủng vi khuẩn *A. tumefaciens*, nồng độ vi khuẩn, thời gian cảm ứng, thời gian nhiễm khuẩn, thao tác xử lý mẫu trước khi chuyển gen. Hiệu quả chuyển gen trong nghiên cứu này đạt 0,90%, tương tự với kết quả của Schöpke [16]. Chúng tôi nhận thấy rằng, kết quả của việc đánh giá này cũng chỉ mang tính tương đối vì có nhiều công trình nghiên cứu cho thấy sau hơn một chu kỳ phát sinh phôi soma, mô dương tính với *gus* biến mất. Hầu hết kết quả này có thể được giải thích bởi sự thật là chỉ có tế bào biểu bì mới được chuyển gen và nó cũng chỉ ra rằng trong phát sinh phôi soma thứ cấp của sắn, phôi phát sinh từ lớp tế bào sâu hơn [9, 17]. Tuy nhiên, đây cũng là cơ sở để xác định quy trình chuyển gen đích AGPase vào cây sắn KM94.

Để tăng biểu hiện enzyme AGPase ở cây sắn (*Manihot esculenta* Crantz), tổng hợp gen *AGPopt* mã hóa AGPase dựa trên trình tự gen suy đoán từ protein glgC ở *E. coli* chủng K12 đã được tiến hành. Ở vi khuẩn, gen này mã hóa cho một enzyme dài 431 amino acid. Dựa trên trình tự amino acid từ *E. coli*, chúng tôi gây đột biến G336D (kết quả thay glycine (G) bởi aspartic acid (D)) và trình tự DNA được tổng hợp theo bộ ba codon tương ứng ở thực vật. Theo công bố của Ihemere [5], 2 đột biến ở vị trí 296 và 336 trên gen glgC của vi khuẩn *E. coli* để thay thế Gly336 bởi Asp và Lys296 bởi Glu. Vị trí đột biến đặc hiệu Gly336 thành Asp loại bỏ điều hòa ngược bởi FBP, làm giảm hoạt tính AGPase so với không đột biến [18]. Vị trí đột biến đặc hiệu thứ 2 Lys296 thành Glu cần thiết để tăng cường hoạt tính của AGPase. Đột biến kép K296E/G336D (Lys296Glu/Gly336Asp) của AGPase vi khuẩn làm giảm điều hòa allosteric khi có mặt trong cây và có hoạt tính tương tự enzyme vi khuẩn ban đầu [18].

Ngoài ra, bổ sung một đoạn nucleotide mã hóa cho chuỗi peptide tín hiệu dẫn protein vào lục lạp có nguồn gốc từ gen *rbcS* mã hóa tiểu phần nhỏ của enzyme ribulose

1,5-bisphosphate carboxylase ở *Arabidopsis* ở đầu 5', đồng thời bộ ba kết thúc (stop codon) để gắn thêm một đoạn DNA mã hóa cho đuôi c-myc và KDEL. Hai vị trí nhận biết của enzyme giới hạn *XbaI* và *SacI* được thêm vào đầu 5' và 3' của gen, theo thứ tự tương ứng. Một trình tự mã hóa cho đuôi c-myc/KDEL cùng khung đọc (frame) tiếp nối sau codon mã hóa cuối cùng của gen. Tóm lại, gen *AGPopt* đã được tổng hợp cho bước tiếp theo tạo dòng vào vector biểu hiện.

Sau các phản ứng cắt vector chuyển gen pBI121, vector tách dòng *pUCIDT-AMP:AGPopt* bởi các enzyme cắt *XbaI* và *SacI* và ghép nối bởi T4 ligase, vector chuyển gen *pBI121/AGPopt* đã được tạo thành, sẵn sàng cho biến nạp vào cây đích. Trong nghiên cứu của Ihemere [5], pBI121 cũng được sử dụng làm vector chuyển gen, tuy nhiên promoter được sử dụng thay thế cho CaMV 35S là 1 đoạn gen chứa promoter patatin Class I 1,0 kb [19], theo sau là một peptide chuyển (400 bp) (TP) vào lục lạp (của cây đậu) [20] gắn với đầu 5' của gen *glgC* của *E. coli* 900 bp chứa đột biến G336D [21].

Để kiểm tra khả năng xâm nhập của gen *AGPopt* và sự hoạt động trong cây đích, vector mang gen *AGPopt* được chuyển vào cây mô hình (cây thuốc lá K326) thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*. Lựa chọn ngẫu nhiên 8/32 dòng thuốc lá dương tính với cặp mồi đặc hiệu để kiểm tra bằng western blot cho thấy 8/8 cây đều có mặt của protein tái tổ hợp, chứng tỏ sự có mặt và hoạt động của gen *AGPopt*. 8 dòng này tiếp tục được kiểm tra hoạt tính của enzyme AGPase, kết quả cho thấy hoạt tính enzyme của cả 8 dòng đều tăng so với đối chứng từ 121-153%, trong đó L7 có hoạt tính tăng mạnh nhất. Đồng thời với kiểm tra hoạt tính enzyme AGPase, 8 dòng này được kiểm tra hàm lượng tinh bột, kết quả cho thấy hàm lượng tinh bột của 8/8 dòng đều tăng so với đối chứng, trong đó dòng có hoạt tính enzyme tăng mạnh nhất cũng là dòng có hàm lượng tinh bột tăng cao nhất (168,99%). Tuy nhiên, hoạt tính enzyme AGPase và hàm lượng tinh bột không phải tỷ lệ thuận với nhau, điều này thể hiện trên kết quả kiểm tra, cụ thể dòng L6 có hoạt tính enzyme tăng thấp nhất (121%) nhưng dòng L2 lại có hàm lượng tinh bột tăng thấp nhất (140,05%) so với đối chứng.

Quy trình chuyển gen *gus* vào cây sắn là cơ sở để chuyển gen đích *AGPopt* vào cây sắn. Chủng *A. tumefaciens* CV58/pGV2260 chứa vector *pBI121/AGPopt* mã hóa AGPase được điều khiển bởi promoter 35S theo sau là một đoạn peptid tín hiệu được chuyển vào giống sắn KM94. Nghiên cứu gần đây của Ihemere [5] cũng sử dụng vector

pBI121 nhưng được điều khiển bởi promoter patatin Class I vào giống sắn TMS 71173. Trong nghiên cứu này, với số lượng mẫu chuyển gen là 1018 cho 6 lô thí nghiệm, các phôi soma trưởng thành khỏe mạnh với lá mầm đã phát triển được lựa chọn. Các mảnh lá mầm sau khi lây nhiễm với huyền phù khuẩn trong 15 phút được đồng nuôi cấy trên môi trường MS bổ sung 12 mg/l picloram chứa chất dẫn dụ acetosyringone (AS) với nồng độ 100 mM. Sau 2 ngày đồng nuôi cấy, các mảnh mô được chuyển sang môi trường CIM mới chứa 500 mg/l cefotaxim và kanamycin 50 mg/l (chọn lọc *nptII*). Sau 1-2 tuần, mảnh mô bắt đầu xuất hiện các phôi soma tại các mép của mảnh mô, được cấy duy trì trên môi trường CIM chọn lọc. Kết quả cho thấy số mẫu tạo phôi thứ cấp là 69, chiếm tỷ lệ 6,78%. Trong khi đó, Ithemere phát hiện trong 26 phôi kháng kháng sinh paromomycin trên tổng số 872 phôi soma nghiên cứu (chiếm tỷ lệ 2,98%) [8]. Sau khi lây nhiễm từ 3 đến 4 tuần, các cụm phôi (mảnh mầm) được chuyển lên môi trường MS bổ sung BAP 0,3 mg/l, chọn lọc bằng kanamycin 50 mg/l để tái sinh cây (tạo chồi). Ithemere [5] đã sử dụng paromomycin làm kháng sinh chọn lọc. Sau 3-4 tuần, chồi xuất hiện từ các cụm phôi. Số chồi xuất hiện dao động 1-2 chồi trên một cụm (mảnh mầm). Trong 69 mẫu tạo phôi thứ cấp, có 4 mẫu tạo thành tổng số 6 chồi. 100% số chồi đều tạo rễ khi chuyển sang môi trường cảm ứng ra rễ, vì vậy có 6 cây hoàn chỉnh được tạo thành. Sau khi đánh giá sơ bộ bằng PCR với cặp mồi đặc hiệu *nptII* và *G336F/G336KDEL R* kết quả cho thấy 5/6 cây tạo thành mang gen *AGPopt*. Trong 26 phôi tạo thành sau chọn lọc, Ithemere (2006) xác định có 5 dòng mang gen chuyển nhờ kỹ thuật PCR. Kết quả này cũng phù hợp với một số nghiên cứu sử dụng *A. tumefaciens* để đưa trực tiếp gen vào cấu trúc của phôi được tạo ra bởi các thùy lá. Điều này có thể xảy ra bằng cách chuyển trực tiếp vào mẫu thùy lá để tạo ra phôi chuyển gen sơ cấp, hoặc bằng cách đồng nuôi cấy với phôi thứ cấp vốn được nhân lên nhanh chóng từ tái sinh phôi đầu tiên. Nuôi cấy tiếp theo trên môi trường chọn lọc đảm bảo chỉ tăng sinh mô chuyển gen, sau đó phục hồi phôi trưởng thành và nảy mầm để tạo cây hoàn chỉnh [22, 23].

Như vậy, nghiên cứu đã thực hiện và hoàn thiện quy trình tái sinh *in vitro* các dòng sắn thương mại tại Việt Nam; tổng hợp được gen nhân tạo *AGPopt* mã hóa AGPase; thiết kế được vector biểu hiện thực vật mang gen mã hóa AGPase và kiểm tra hoạt động của gen trên cây thuốc lá; xây dựng được quy trình chuyển gen chỉ thị chọn lọc *gus* vào cây sắn KM94, dựa vào đó chuyển gen *AGPopt* tổng hợp nhân tạo vào cây sắn KM94, bước đầu xác định được

sự có mặt của gen *AGPopt* trong cây sắn KM94.

Nghiên cứu là công trình đầu tiên ở Việt Nam công bố về các nghiên cứu tái sinh và chuyển gen qua phôi soma trên đối tượng cây sắn đang được canh tác ở Việt Nam. Kết quả này là cơ sở khoa học và thực tiễn cho các nghiên cứu nhân nhanh và chọn tạo dòng sắn có sản lượng tinh bột được cải thiện.

Kết luận

1. Quy trình tái sinh cây sắn thông qua phôi soma từ đỉnh chồi và thùy lá non của 2 giống sắn KM140 và KM94 ở Việt Nam đã được tối ưu trên môi trường MS bổ sung picloram 12 mg/l và tái sinh trên môi trường BAP 0,3 mg/l. Từ đó quy trình chuyển gen thông qua *A. tumefaciens* vào cây sắn được xây dựng với phôi soma đạt hiệu quả chuyển gen 0,90%.

2. Thông qua tối ưu hoá mã di truyền, bổ sung đột biến thay thế G336D, gắn với trình tự đoạn mã hóa peptide tín hiệu và bổ sung đuôi c-myc, KDEL, trình tự nhận biết enzyme *XbaI* và *SacI* trên cơ sở gen *glgC* của *E. coli* K12, gen *AGPopt* được tổng hợp nhân tạo gồm 1527 bp và thiết kế với vector pBI121 thành vector chuyển gen.

3. Gen *AGPopt* được chứng minh có khả năng làm tăng hoạt tính của enzyme AGPase và hàm lượng tinh bột ở lá của cây thuốc lá mô hình.

4. Cấu trúc gen *AGPopt* đã được sử dụng chuyển vào cây sắn KM94 thông qua phôi soma nhờ *A. tumefaciens*, tạo 6 cây hoàn chỉnh. Bước đầu kiểm tra được sự có mặt của gen *AGPopt* trong cây sắn chuyển gen: 5/6 cây có mặt gen *nptII* và *AGPopt*.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] T.E. Abraham (1996), "Dry extraction of starch from cassava tubers. In: G.T. Kurup, M.S. Palaniswami, V.P. Pottty, G. Padmaja, S. Kabeerathumma, S.V. Pillai (eds) *Tropical Tuber Crops: problems, prospects and future strategies*", Science Publisher INC., Lebanon, New Hampshire.
- [2] Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn (2016), *Diện tích, năng suất, sản lượng sắn của Việt Nam năm 2016*, Báo cáo thường niên.
- [3] B.B. Buchanan, W. Gruissem, L.J. Russell (2002), "Biochemistry and Molecular Biology of Plant", *Printed United State of America*, pp.637-643.
- [4] A.A. Iglesias, G.F. Barry, C. Meyer, L. Bloksberg, P.A. Nakata, T. Greene, M.J. Laughlin, T.W. Okita, G.M. Kishore, J. Preiss (1993), "Expression of the potato tuber ADP-glucose pyrophosphorylase in *Escherichia coli*", *Biology Chemistry*, **268**, pp.1081-1086.
- [5] U. Ithemere, A. Diana, L. Susan, S. Richard (2006), "Genetic modification of cassava for enhanced starch production", *Plant Biotechnology Journal*, **4(4)**, pp.453-465.
- [6] H.Q. Li, C. Sautter, I. Potrykus, J. Puonti-Kaerlas (1996), "Genetic transformation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz)", *Nature Biotechnology*, **14**, pp.736-740.

- [7] P. Zhang, S. Phansiri, J. Puonti-Kaerlas (2001), "Improvement of cassava shoot organogenesis by the use of silver nitrate *in vitro*", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **67**, pp.47-54.
- [8] K. Konstantin, M. Shalini, T.A. Belay (2016), "Extraction and Assays of ADP-glucose Pyrophosphorylase, Soluble Starch Synthase and Granule Bound Starch Synthase from Wheat (*Triticum aestivum* L.) Grains", *Bio-protocol*, **6(18)**, p.e1920.
- [9] J.A. Stamp, G.G. Henshaw (1987), "Secondary somatic embryogenesis and plant regeneration in cassava", *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **10**, pp.227-233.
- [10] L. Szabados, R. Hoyos, W. Roca (1987), "In vitro somatic embryogenesis and plant regeneration of cassava", *Plant Cell Reports*, **6**, pp.248-251.
- [11] C.J.J.M. Raemakers, C.M. Schavemaker, E. Jacobsen, R.G.F. Visser (1993), "Improvements of cyclic somatic embryogenesis of cassava", *Plant Cell Reports*, **12**, pp.226-229.
- [12] T.C. Narayanaswamy, N.M. Ramaswamy, R. Sree (1995), "Somatic embryogenesis and plant regeneration in cassava. In: The Cassava Biotechnology Network", *Proceeding of the Second International Scientific Meeting*, Bogor, Indonesia, pp.24-329.
- [13] T. Murashige, F. Skoog (1962), "A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco cultures", *Physiologia Plantarum*, **15**, pp.473-497.
- [14] P. Zhang, I. Potrykus, J. Puonti-Kaerlas (2000), "Efficient production of transgenic cassava using negative and positive selection", *Transgenic Research*, **9**, pp.405-415.
- [15] N.J. Taylor, P. Chavarriaga, K. Raemakers, D. Siritunga, P. Zhang (2004), "Development and application of transgenic technologies in cassava", *Plant Molecular Biology*, **56**, pp.671-688.
- [16] C. Schöpke, N. Taylor, R. Carcamo, D.K. Konan, P. Marmey, G.G. Henshaw, R.N. Beachy, C.M. Fauquet (1996), "Regeneration of transgenic cassava plants (*Manihot esculenta* Crantz) from micro-bombarded embryogenic suspension cultures", *Nature Biotechnology*, **14(6)**, pp.731-735.
- [17] C.J.J.M. Raemakes, E. Sofiari, E. Kanju, E. Jacobsen, R.G.F. Visser (1995), "NAA-induced somatic embryogenesis in casava. In: Cassava Biotechnology Network (ed.)", *Proceedings Second International Scientific Meeting*, Bogor, Indonesia, pp.355-363.
- [18] A. Kumar, P. Ghosh, Y.M. Lee, M.A. Hill, J. Preiss (1989), "Biosynthesis of bacterial glycogen: determination of the amino acid changes that alter the regulatory properties of a mutant *E. coli* ADP-glucose synthase", *Journal of Biology Chemistry*, **264**, pp.10464-10471.
- [19] S.Y. Kim, G.D. May, W.D. Park (1994), "Nuclear protein factors binding to a class I patatin promoter region are tuber-specific and sucrose-inducible", *Plant Molecular Biology*, **26**, pp.603-615.
- [20] S. Anderson, S.M. Smith (1986), "Synthesis of the small subunit of ribulose-bisphosphate carboxylase from genes cloned into plasmids containing the SP6 promoter", *Biochem Journal*, **240**, pp.709-715.
- [21] P.A. Baecker, C.E. Furlong, J. Preiss (1983), "Biosynthesis of bacterial glycogen: primary structure of *Escherichia coli* ADP-glucose synthetase as deduced from the nucleotide sequence of the *glgC* gene", *Journal of Biological Chemistry*, **258**, pp.5084-5088.
- [22] R. Sarria, E. Torres, F. Angel, P. Chavarriaga, W.M. Roca (2000), "Transgenic plants of cassava (*Manihot esculenta*) with resistance to Basta obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation", *Plant Cell Reports*, **19**, pp.339-344.
- [23] D. Siritunga, R.T. Sayre (2003), "Generation of cyanogen-free transgenic cassava", *Planta*, **217**, pp.367-373.