

CHUYỂN GEN KHÁNG SÂU *cry1Ab*, *cry1B-cry1Ab* VÀO CÂY MÍA (*Saccharum officinarum* L.)

Phan Tường Lộc*, Hoàng Văn Dương, Mai Trường, Lê Tấn Đức, Trần Thị Ngọc Hà,
Văn Đắc Thành, Phạm Đức Trí, Nguyễn Thị Thanh, Nguyễn Hữu Hổ

Viện Sinh học Nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

Email*: locphan@itb.ac.vn

Ngày gửi bài: 25.07.2014

Ngày chấp nhận: 14.10.2014

TÓM TẮT

Giống mía VN84-4137 qua bước đầu khảo sát khả năng đáp ứng chuyển gen với các kết quả khả quan, được tiếp tục thực hiện các bước trong nghiên cứu biến nạp gen *Bt* tổng hợp *cry1Ab* và gen lai tổng hợp *cry1B-cry1Ab*. Mô sẹo sau khi gây nhiễm với *Agrobacterium tumefaciens* được chọn lọc trên môi trường tạo mô sẹo có phosphinothricin (PPT) 3 mg/l. Các khối mô sẹo phát triển tốt được chuyển sang môi trường tái sinh chọn lọc để nhận các chồi kháng. Ba dòng chuyển gen *cry1Ab* và 1 dòng chuyển gen *cry1B-cry1Ab* được xác định sau khi phân tích di truyền bằng PCR và Southern blot. Khi kiểm tra biểu hiện protein với que thử nhanh, cả bốn dòng chuyển gen đều cho kết quả dương tính. Các cây chuyển gen đều có kiểu hình bình thường và phát triển tốt khi trồng trong vườn ươm.

Từ khóa: *Agrobacterium tumefaciens*, cây mía, chuyển gen, *cry1Ab*, *cry1B-cry1Ab*, kháng sâu

Transformation of Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) with Insect Resistance Genes *cry1ab*, *cry1b-cry1ab*

ABSTRACT

The sugarcane variety VN84-4137 that was successfully confirmed with preliminary transformation experiments was further transformed with *Bt* genes including a single synthetic gene *cry1Ab* and a hybrid synthetic gene *cry1B-cry1Ab*. After infection and co-culture with *Agrobacterium*, sugarcane calli were selected on callus induction medium with 3 mg/l phosphinothricin (PPT). Resistant calli were transferred to selective regeneration medium for shoot induction. Three *cry1Ab* lines and one *cry1B-cry1Ab* transgenic line were identified by PCR and Southern blot. Protein expression of *Cry1Ab* and *Cry1B-Cry1Ab* assayed by quick test kit gave positive results. Transgenic plants exhibited a normal phenotype.

Keywords: transformation, sugarcane, *Agrobacterium tumefaciens*, *cry1Ab*, *cry1B-cry1Ab*, insect resistance.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Chuyển gen biểu hiện độc tố Bt (de Maagd et al., 2001; Schnepf et al., 1998) có nguồn gốc từ vi khuẩn *Bacillus thuringiensis*, trên thực vật đã được nghiên cứu ứng dụng trên nhiều đối tượng khác nhau nhằm nâng cao khả năng kháng sâu một cách đặc hiệu của cây trồng, bảo đảm hiệu quả canh tác và tránh sự lạm dụng thuốc trừ sâu quá nhiều gây ảnh hưởng đến môi trường và sức khỏe con người. Trong thời kỳ

đầu, các gen *cry* mã hóa độc tố được sử dụng ở dạng tự nhiên, sau đó, để tăng mức biểu hiện và tính độc, các gen này được tổng hợp nhân tạo với nhiều biến đổi về trình tự, ngoài ra, chúng còn có thể được kết hợp với nhau để tạo hiệu ứng pyramiding khi biểu hiện (Arvinth et al., 2010).

Do sâu đục thân mía gây hại từ bên trong thân (Phan Tường Lộc và cs., 2012; Fauconnier et al., 1993) và ruộng mía trưởng thành có mật độ cây mọc dày đặc, lá rất sắc, gây khó khăn cho việc phun xịt thuốc (Fauconnier et al., 1993)

nên việc kháng sâu thông qua biểu hiện gen *Bt* có ý nghĩa thực tế đáng kể (Arencibia et al., 1997; Christou et al., 2006; de Maagd et al., 2001). Nghiên cứu chuyển các gen kháng sâu *cry1Ab* (Arvinth et al., 2010; Arvinth et al., 2009; Braga et al., 2003; de Maagd et al., 2001) và gen *cry1B-cry1Ab* (Bohorova et al., 2001; de Maagd et al., 2001) vào giống mía VN84-4137 (Việt Nam) đã được chúng tôi thực hiện, bước đầu cho những kết quả khả quan về nuôi cấy mô mía *in vitro*, khả năng đáp ứng chuyển gen đối với giống mía và chọn lọc được mô sẹo mía kháng PPT sau khi gây nhiễm với *Agrobacterium tumefaciens* (Phan Tường Lộc và cs., 2012). Các nghiên cứu tiếp theo về hoàn thiện chọn lọc, phân tích di truyền, đánh giá hình thái và xác định biểu hiện protein Cry1Ab và Cry1B-Cry1Ab của cây mía chuyển gen được chúng tôi giới thiệu trong báo cáo này.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Vật liệu

- Giống mía VN84-4137 được cung cấp bởi Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Mía Đường, xã Phú An, huyện Bến Cát, tỉnh Bình Dương.

- Hai chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* mang vector plasmid dùng để chuyển gen như sau:

+ Plasmid pCRY1B-1Ab có kích thước khoảng 17kb, vùng T-DNA mang cấu trúc biểu hiện gen kháng sâu *Pubi/cry1B-cry1Ab/Tnos* (*cry1B-cry1Ab*: gen lai - tổng hợp) và cấu trúc biểu hiện gen kháng PPT dùng để chọn lọc *P70S/bar/V35S*.

+ Plasmid pCAMBIA3301-cry1Ab, đã được biến nạp và giữ trong *E. coli*, có kích thước 15,6kb, vùng T-DNA mang cấu trúc biểu hiện gen kháng sâu *Pubi-1/cry1Ab/Tnos* và cấu trúc biểu hiện gen kháng PPT dùng để chọn lọc *P35S/bar/V35S*.

- Môi trường nuôi cấy thực vật bao gồm các thành phần được phối hợp cụ thể theo các mục đích nuôi cấy khác nhau như sau: các khoáng của môi trường MS (Murashige-Skoog, 1962);

các vitamin của môi trường MS hoặc B5 (Gamborg, 1968); casein 0,5 g/l; đường sucrose 30 g/l; agar 10 g/l; chất điều hòa sinh trưởng 6-Benzyladenine (BA), α -Naphthalene acetic acid (NAA) và 2,4-dichlorophenoxy acetic acid (2,4-D). pH của môi trường được điều chỉnh ở 5,8.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Kiểm tra sự hiện diện của các gen *bar*, *cry1Ab* và *cry1B-cry1Ab* bằng phương pháp PCR

Thành phần của phản ứng PCR gồm 5 μ l buffer PCR 5X, 0,5 μ l dNTP 10mM, 0,25 μ l taq polymerase 5 U/ μ l, 2 μ l mỗi xuôi 1 μ M, 2 μ l mỗi ngược 1 μ M, 1 μ l DNA khuôn, thêm nước cất vừa đủ thể tích 25 μ l.

Trình tự các gen cần nhận diện được khuếch đại thông qua các môi và các chương trình nhiệt của phản ứng PCR như sau:

- Gen *cry1Ab*: mỗi xuôi (p1) 5'-TTCCTTGGACGAAATCCCACC-3'; mỗi ngược (p2) 5'-GCC AGAATTGAACACATGAGCGC-3'; kích thước đoạn DNA mục tiêu khuếch đại là 559bp; chương trình nhiệt phản ứng PCR: 94 °C/4 phút, [94 °C/30 giây, 54 °C/1 phút, 72 °C/90 giây] (35 chu kỳ), 72°C/10 phút.

- Gen *bar*: mỗi xuôi (p5) 5'-ATGAGCCCAGAACGACG-3'; mỗi ngược (p6) 5'-TCAGATCTCGGTGACGG-3'; kích thước đoạn DNA mục tiêu khuếch đại là 500 bp; chương trình nhiệt phản ứng PCR: 94°C/5 phút, [94°C/1 phút, 62°C/1 phút, 72°C/1 phút 30 giây] (35 chu kỳ), 72°C/5 phút.

Sản phẩm PCR được bảo quản ở 4°C cho đến khi dùng.

2.2.2. Phân tích Southern blot

Phân tích Southern blot được thực hiện với bộ kit Amersham ECL Direct Nucleic Acid Labelling And Detection Systems (GE Healthcare, UK) và quy trình của GE Healthcare (GE Healthcare, 2006). Probe là đoạn trình tự của gen *cry1Ab* được dòng hóa bằng PCR có kích thước 559bp. Các băng DNA lai được ghi nhận bằng phim X quang âm bản của Fuji thông qua phản ứng phát sáng quang hóa.

2.2.3. Kiểm tra biểu hiện của gen cry1Ab, cry1Ab-1B trong các dòng chuyển gen bằng kit thử nhanh

Protein Cry1Ab và Cry1B-Cry1Ab biểu hiện trong các dòng mía chuyển gen được xác định bằng kit thử nhanh Cry1Ab/Cry1Ac lateral flow Quickstix Strip™ của Envirologix, thông qua một phản ứng miễn dịch với protein Cry1Ab có kết hợp hiện màu. Phản ứng dương tính cho hai vạch hiện màu, trong khi phản ứng âm tính chỉ cho một vạch hiện màu trên que thử (Envirologix Inc., 2012).

Mô lá của cây chuyển gen được nghiền lấy dịch và cho thấm vào đầu nạp mẫu của que thử. Để que ở nhiệt độ phòng và xem kết quả (Envirologix Inc., 2012).

2.2.4. Đánh giá kiểu hình của các dòng mía chuyển gen trồng trong vườn ươm

Các dòng mía chuyển gen và đối chứng được chuyển ra trồng trong vườn ươm và ghi nhận các thông số kiểu hình về chiều cao thân, đường kính thân, số lá, kích thước lá ở các thời điểm bắt đầu trồng, 30 ngày và 60 ngày sau khi trồng. Qua đó, đánh giá khả năng sinh trưởng của các dòng mía chuyển gen so với đối chứng.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Chọn lọc cây chuyển gen

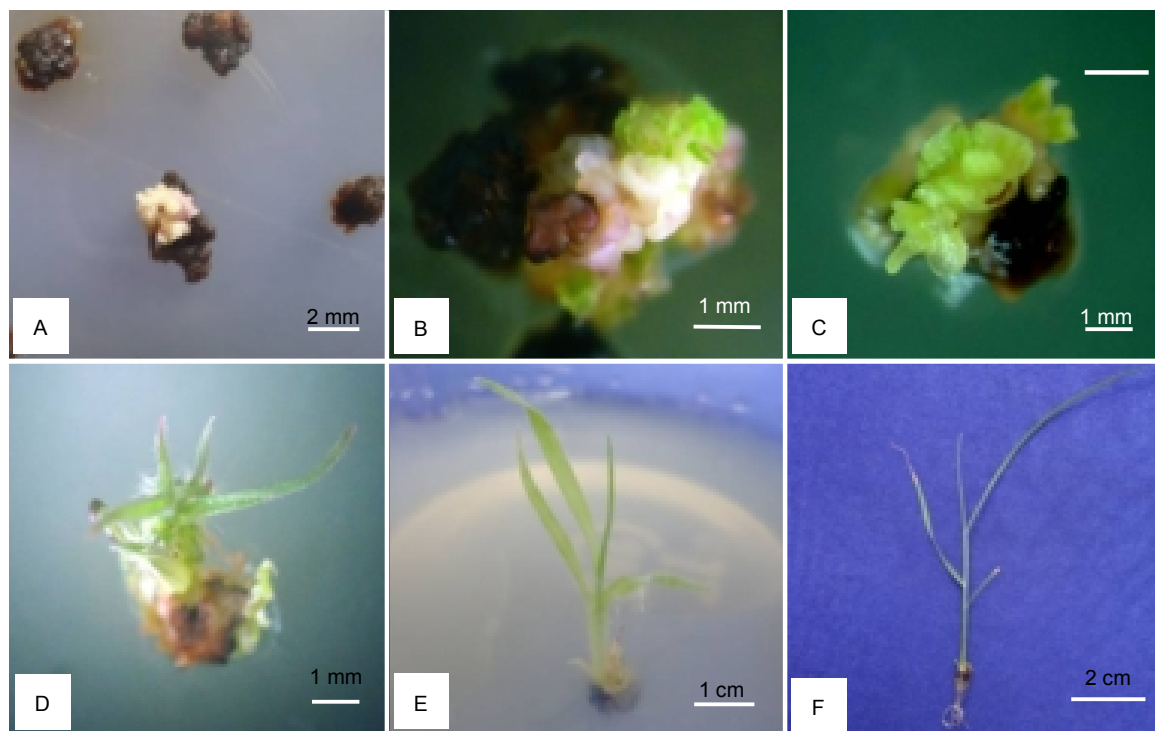
Mô sẹo mía sau khi gây nhiễm với các chủng *Agrobacterium tumefaciens* mang plasmid pCRY1B-1Ab hoặc pCAMBIA3301-cry1Ab được chọn lọc trên môi trường tạo mô sẹo (Phan Tường Lộc và cs., 2012) có bổ sung PPT ở nồng độ 3 mg/l và kháng sinh diệt khuẩn cefotaxime ở nồng độ 500 mg/l. Một số cụm mô nhỏ nằm xen trong các khối mô kháng được PPT và tiếp tục phát triển gia tăng kích thước. Sau 1 tháng các khối mô sẹo kháng PPT và phát triển tốt (Hình 1A) được chuyển sang môi trường tái sinh chọn lọc (Phan Tường Lộc và cs., 2012) có bổ sung PPT 3 mg/l. Kháng sinh cefotaxime vẫn được duy trì trong môi trường ở nồng độ 500 mg/l để tránh *Agrobacterium tumefaciens* tái nhiễm. Một vài khối mô bắt đầu có sự phát sinh hình thái chồi, tạo thành các điểm màu xanh sau 7 ngày (Hình 1B). Các sơ khởi lá phát triển

sau khoảng 3 tuần tạo thành các chồi hoàn chỉnh (Hình 1C, D) và sau 6 tuần đạt chiều cao khoảng 2,5cm, các chồi tạo thành đều có kiểu hình bình thường, lá màu xanh, phiến lá rộng, dài (Hình 1E). Có 3 chồi tách biệt thu được từ các cụm mô được gây nhiễm với chủng A. *tumefaciens* mang plasmid pCAMBIA3301-cry1Ab và 1 chồi thu được từ mô gây nhiễm với chủng mang plasmid pCRY1B-1Ab. Các khối mô còn lại không thể tái sinh chồi, đều bị hoá đen và chết.

Các chồi thu được ở trên được chuyển sang môi trường MS có bổ sung NAA 3 mg/l, PPT 3 mg/l và cefotaxime 500 mg/l. Sau 1 tháng, chồi phát triển thành cây hoàn chỉnh với bộ rễ được hình thành dài khoảng 2cm, thân có chiều cao khoảng 3,5cm (Hình 1F). Cấy chuyển các cây này sang môi trường MS không có chất điều hòa sinh trưởng, có bổ sung chất chọn lọc PPT 3 mg/l, cây tiếp tục phát triển, sau 4 tuần có lá xanh tốt, rễ gia tăng về số lượng và chiều dài trong khi cây đối chứng ngừng phát triển lá mất dần màu xanh, hóa nâu và chết.

Kết quả thu được 3 dòng chuyển gen cry1Ab giả định được quy định là các dòng V1, V2, V3 và 1 dòng chuyển gen cry1B-cry1Ab giả định được quy định là V4.

Quy trình chuyển gen của chúng tôi được tham khảo theo báo cáo của Santosa (Santosa et al., 2004). Tác giả này sử dụng mô sẹo làm nguyên liệu chuyển gen với *Agrobacterium tumefaciens* thay vì mô phân sinh trong lõi ngọn của cây mía *ex vitro* như các công trình khác (Enriquez-Obregon et al., 1998). Ưu điểm của phương pháp, theo tác giả, là rút ngắn được thời gian tạo cây chuyển gen. Ngoài ra, tác giả cũng đề cập đến tình trạng vi khuẩn bị tái nhiễm và không thể diệt được hoàn toàn trong quá trình nuôi cấy, chọn lọc, khi dùng mô phân sinh chuyển gen (Santosa et al., 2004). Trong nghiên cứu của chúng tôi, thời gian từ gây nhiễm mô sẹo đến khi nhận được mô sẹo kháng PPT, có biểu hiện GUS khoảng 1,5 tháng, tương tự với báo cáo của tác giả Santosa (Santosa et al., 2004). Các cây chuyển gen hoàn toàn không gặp tình trạng tái nhiễm sau khi ngừng bổ sung cefotaxime ở giai đoạn ra rễ.



Hình 1. Quá trình chọn lọc và tái sinh các thể chuyển gen lúa

Ghi chú: A: mô sẹo sau 1 tháng chọn lọc trên môi trường có bổ sung PPT 3 mg/l; B: mô sẹo bắt đầu tái sinh chồi sau 7 ngày chuyển sang môi trường tái sinh chọn lọc; C: các phôi thể lá hình thành sau 12 ngày; D: chồi phát triển sau khoảng 3 tuần; E: chồi phát triển đạt chiều cao khoảng 2,5 cm sau 1,5 tháng; F: cây phát triển hoàn chỉnh với rễ dài khoảng 2 cm, chiều cao thân khoảng 3,5 cm sau 1 tháng chuyển chồi sang môi trường tạo rễ.

3.2. Phân tích PCR

DNA ly trích từ các dòng lúa chuyển gen giả định kháng tốt PPT ở nồng độ 3 mg/l, cây nguyên bản và plasmid *pCAMBIA3301-Cry1Ab* ly trích từ vi khuẩn *E.coli* được dùng để phân tích PCR nhằm xác định sự hiện diện của các gen chuyển. Kết quả điện di các sản phẩm PCR ghi nhận được như sau:

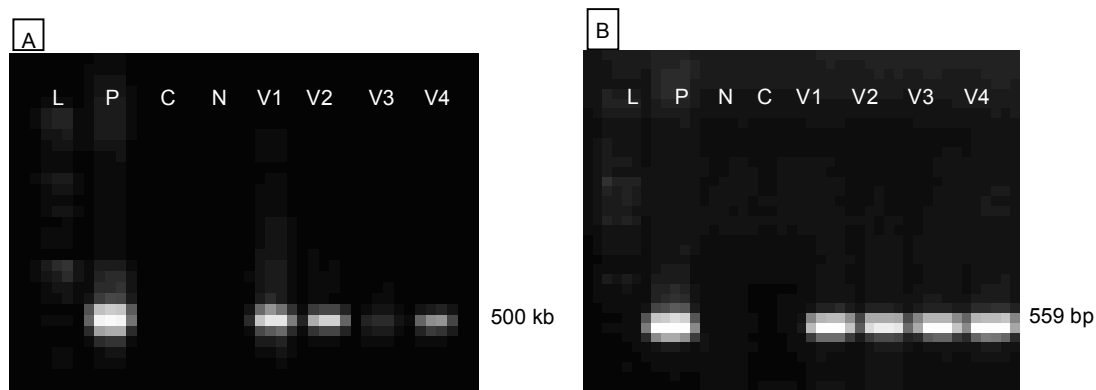
Ở hình 2A cho thấy, khi khuếch đại trình tự gen *bar* bằng môi chuyên biệt, ở mẫu đối chứng dương P và các dòng chuyển gen giả định V1, V2, V3, V4 đều có băng như mong muốn với kích thước 500bp. Kết quả này chứng tỏ có sự hiện diện của gen *bar* trong tất cả các dòng chuyển gen V1, V2, V3, V4. Ngoài ra, ở hình 2B, khi khuếch đại trình tự gen *cry1Ab* bằng môi chuyên biệt, ở mẫu đối chứng dương P và các

dòng chuyển gen giả định V1, V2, V3, V4 đều có băng như mong muốn với kích thước khoảng 559bp. Như vậy, ở các dòng V1, V2, V3 có sự hiện diện của gen *cry1Ab* và ở dòng V4 có sự hiện diện của gen kết hợp *cry1B-cry1Ab*.

3.3. Phân tích Southern blot

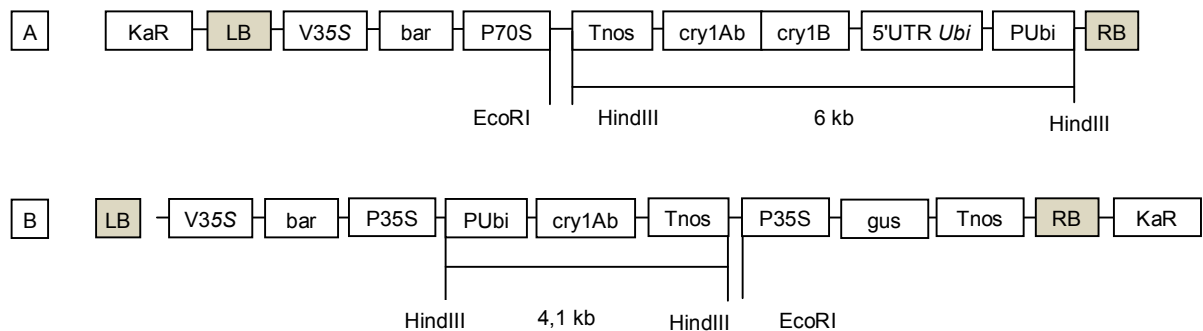
Để xác định sự hòa nhập T-DNA của các vector plasmid vào trong bộ gen, các dòng lúa chuyển gen V1, V2, V3, V4 được phân tích Southern blot. DNA bộ gen ly trích từ lá lúa của cây *ex vitro* trồng trong nhà lưới được cắt với các enzyme giới hạn *HindIII* và *EcoRI*. Các enzyme này có vị trí cắt trên T-DNA của hai plasmid *pCRY1B-1Ab* và *pCAMBIA3301-Cry1Ab* như hình 3. Mỗi lai là trình tự DNA trên gen *cry1Ab* có kích thước 559bp.

Chuyển gen kháng sâu cry1ab, cry1b-cry1ab vào cây mía (*Saccharum officinarum* L.)



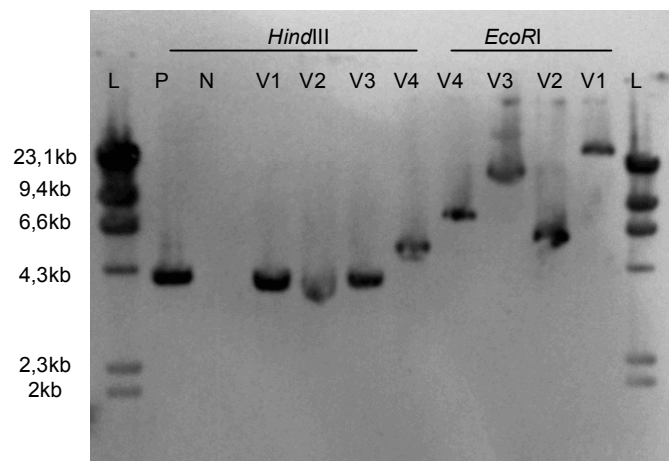
Hình 2. Phân tích PCR kiểm tra sự hiện diện của gen *bar* (A) và gen *cry1Ab* (B)

Ghi chú: A. L: thang chuẩn; P: đối chứng dương; N: đối chứng âm cây nguyên bản; C: nước cất; V1, V2, V3: các dòng chuyển gen *cry1Ab* giả định; V4: dòng chuyển gen *cry1B-cry1Ab* giả định.
B. L: thang chuẩn; P: đối chứng dương; N: đối chứng âm cây nguyên bản; C: nước cất; V1, V2, V3: các dòng chuyển gen *cry1Ab* giả định; V4: dòng chuyển gen *cry1B-cry1Ab* giả định.



Hình 3. Sơ đồ cắt giới hạn trên các vector plasmid

Ghi chú: A. Plasmid pCAMBIA3301-Cry1Ab; B. Plasmid pCRY1B-1Ab.



Hình 4. Kết quả phân tích Southern blot các dòng chuyển gen

Ghi chú: L: thang chuẩn λ Hind III; P: đối chứng dương từ plasmid pCAMBIA3301-Cry1Ab; N: cây nguyên bản; V1, V2, V3: các dòng chuyển gen *cry1Ab*, V4: dòng chuyển gen *cry1B-1Ab*.

Khi cắt DNA tổng số của các dòng mía chuyển gen V1, V2, V3, V4 với enzyme giới hạn *HindIII*, kết quả lai được phát hiện trên phim như sau:

Ở mẫu đối chứng dương và 3 dòng chuyển gen V1, V2, V3 đều xuất hiện 1 băng lai ở kích thước khoảng 4,1kb, dòng chuyển gen V4 có 1 băng ở kích thước khoảng 6kb, trong khi mẫu đối chứng âm không có băng (Hình 4). Kết quả này chứng tỏ trình tự T-DNA trên các vector plasmid được chuyển nguyên vẹn vào bộ gen của các dòng mía chuyển gen, không có trường hợp các trình tự bị gãy, đứt.

Khi cắt DNA tổng số của các dòng mía chuyển gen với enzyme giới hạn *EcoRI*, kết quả lai được ghi nhận như sau:

Ở các dòng V1, V2, V3, V4 đều xuất hiện một băng lai đậm, dày, rõ nét có kích thước khác nhau. Kết quả này cho thấy các dòng mía chuyển gen đều có sự chèn ngẫu nhiên một bản của đoạn T-DNA vào trong bộ gen của cây. Ngoài ra, ở dòng V1, V2, V3 còn xuất hiện các băng khá mờ, không đầy đủ so với các băng lai nêu trên cũng như so với các băng lai khi cắt bằng enzyme giới hạn *HindIII*, một số băng có kích thước bằng nhau ở các dòng. Các băng này xuất hiện có thể do sự điện di DNA trên gel không triệt để gây ra và không được xem như là các bản chèn ở các vị trí khác trên bộ gen của cây chuyển gen.

Với kết quả phân tích Southern blot trên, có thể khẳng định các dòng V1, V2, V3 là các dòng chuyển gen độc lập khác nhau, trình tự T-DNA mang các cấu trúc biểu hiện chuyển vào các dòng V1, V2, V3, V4 nguyên vẹn. Số lượng bản

của trình tự T-DNA chèn vào bộ gen của các dòng chuyển gen là 1.

3.4. Phân tích biểu hiện gen *cry1Ab*, *cry1B-cry1Ab* trong các dòng mía chuyển gen bằng kit thử nhanh

Dịch nghiền từ mô lá của các dòng mía chuyển gen và nguyên bản trong các điều kiện nuôi cấy *in vitro* và *ex vitro* ở các thời điểm khác nhau được kiểm tra bằng kit thử nhanh “Cry1Ab/Cry1Ac lateral flow Quickstix Strip” để xác định sự có mặt của các protein tái tổ hợp Cry1Ab và Cry1B-Cry1Ab dựa trên phản ứng miễn dịch kết hợp hiện màu đặc hiệu với kháng nguyên Cry1Ab. Kết quả được thể hiện ở bảng 1 như sau:

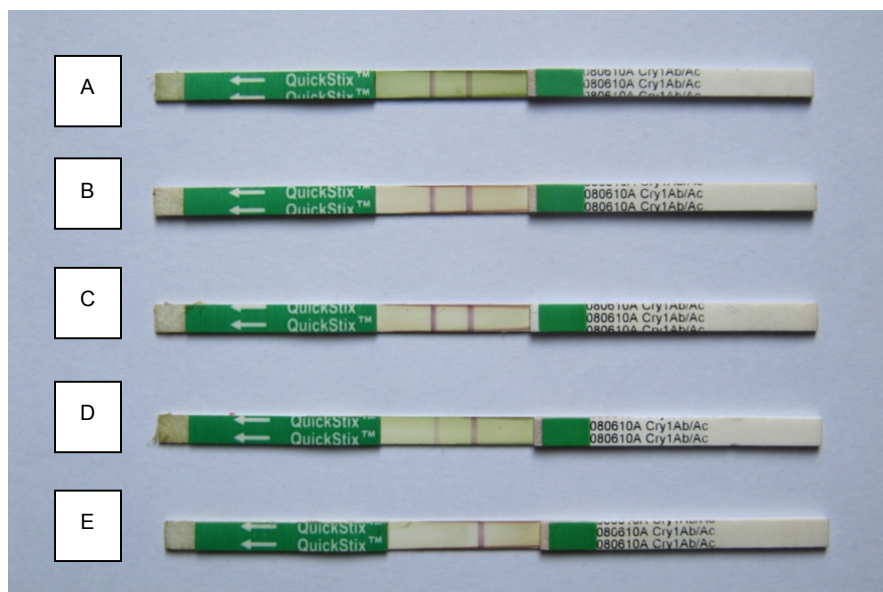
Ở các dòng chuyển gen V1, V2, V3, V4 đều có kết quả dương tính (Hình 5), dòng nguyên bản (NB) có kết quả âm tính. Điều này cho thấy các dòng V1, V2, V3 có biểu hiện protein tái tổ hợp Cry1Ab. Kết quả dương tính ở dòng V4 cho thấy gen lai *cry1B-cry1Ab* có biểu hiện protein tái tổ hợp và có thể được nhận dạng bởi que thử thông qua protein Cry1Ab nằm trong tổ hợp Cry1B-Cry1Ab.

Cấu trúc biểu hiện gen lai *cry1B-cry1Ab* trong nghiên cứu của chúng tôi tương đồng với cấu trúc của tác giả Ho thực hiện chuyển gen vào lúa (Ho et al., 2006). Theo các kết quả phân tích của Ho, gen *cry1B-cryAb* có biểu hiện ở các dòng lúa chuyển gen; kết quả kiểm tra protein kết hợp Cry1B-Cry1Ab bằng kit thử nhanh cùng loại trên các dòng lúa chuyển gen trùng khớp với kết quả phân tích Western blot. Do đó, khi kết quả kiểm tra biểu hiện protein ở dòng

Bảng 1. Kiểm tra biểu hiện protein tái tổ hợp Cry1Ab và Cry1B-Cry1Ab ở các dòng chuyển gen bằng kit thử nhanh

Điều kiện nuôi	Các dòng mía chuyển gen và nguyên bản				
	NB	V1	V2	V3	V4
<i>In vitro</i>	-	+	+	+	+
<i>Ex vitro</i>					
30 ngày	-	+	+	+	+
60 ngày	-	+	+	+	+

Ghi chú: (+): dương tính; (-): âm tính



Hình 5. Kiểm tra biểu hiện gen bằng que thử nhanh trên các dòng mía trồng trong vườn ươm ở ngày 60

Ghi chú: A, B, C, D: các dòng chuyển gen tương ứng V1, V2, V3, V4; E: cây mía nguyên bản.

V4 bằng kit thử dương tính, chúng tôi xem như protein kết hợp Cry1B-Cry1Ab đã được biểu hiện. Tuy nhiên, để xác định rõ hơn, có thể tiếp tục phân tích sự biểu hiện của protein này bằng phương pháp Western blot với các kháng thể đặc hiệu. Như vậy, qua các thời điểm kiểm tra cho thấy, sự biểu hiện protein tái tổ hợp ở các dòng mía chuyển gen ổn định, bền vững trong các giai đoạn nuôi cấy *in vitro* và *ex vitro*.

3.5. Kiểm tra khả năng kháng thuốc diệt cỏ Basta của các dòng mía chuyển gen

Để xác định biểu hiện của gen *bar* trong điều kiện tự nhiên, các dòng mía chuyển gen *in vitro* có chiều cao thân khoảng 10cm được chuyển ra trồng trong vườn ươm và phun dịch Basta theo thành phần PPT ở nồng độ 150 mg/l (Phan Tường Lộc và cs., 2012) khi cây được 1,5 tháng tuổi. Mỗi lô kiểm tra của các dòng chuyển gen gồm có 3 cây.

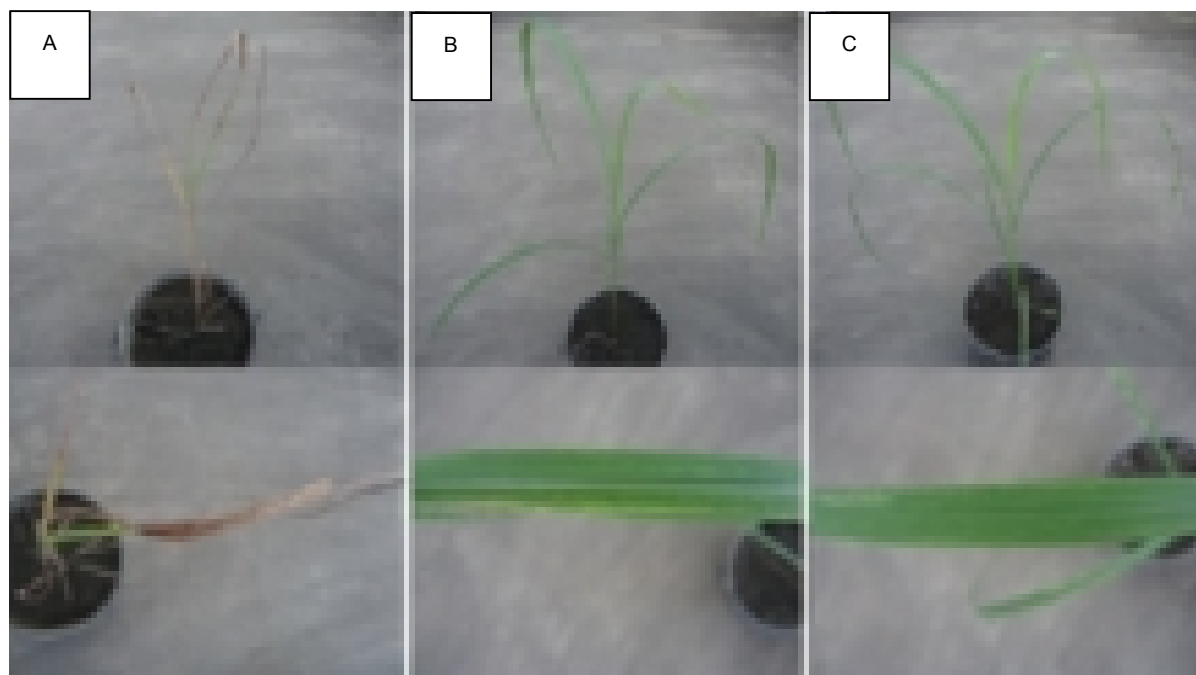
Kết quả ghi nhận sau một tuần cho thấy, ở lô nguyên bản, tất cả các cây đều có lá bị cháy khô hoàn toàn (Hình 6A), ngược lại ở lô của các dòng chuyển gen V1, V2, V3 (Hình 6B) và V4

(Hình 6C) lá vẫn xanh và phát triển bình thường, hầu như không bị ảnh hưởng bởi PPT. Điều này chứng tỏ gen *bar* của các dòng chuyển gen đều biểu hiện hiệu quả qua các giai đoạn sinh trưởng của cây.

3.6. Đánh giá kiểu hình của các dòng mía chuyển gen trồng trong vườn ươm

Các dòng mía chuyển gen V1, V2, V3, V4 trong điều kiện *in vitro* có kiểu hình lá xanh và phát triển bình thường so với cây đối chứng. Để quan sát các đặc điểm hình thái trong điều kiện *ex vitro*, các dòng này được đưa ra trồng trong vườn ươm và theo dõi các chỉ số về chiều cao thân, số lá, kích thước lá, đường kính thân. Chiều cao thân được tính từ gốc đến ngọn mía, bỏ phần lá. Đường kính thân được lấy ở vị trí có kích thước tối đa. Chiều dài lá được đo từ cuống đến ngọn lá, chiều rộng lá được đo ở vị trí có kích thước to nhất.

Kết quả ghi nhận cho thấy những dòng mía chuyển gen sinh trưởng tốt, có kiểu hình bình thường và không có sự khác biệt đáng kể khi so sánh với kiểu hình của cây nguyên bản (Hình 7).

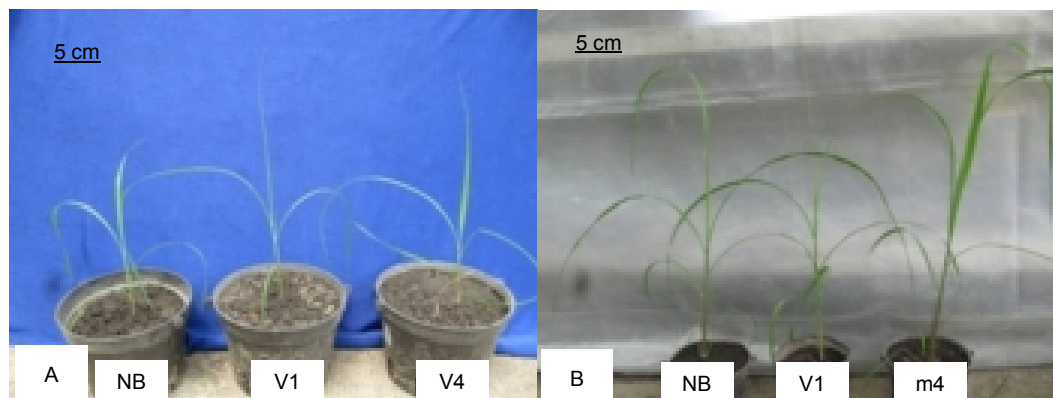


Hình 6. Cây mía nguyên bản và chuyển gen trồng trong vườn ươm được phun dung dịch Basta ở nồng độ PPT 150 mg/l

Ghi chú: A: cây nguyên bản; B: dòng chuyển gen *cry1B-1Ab*; C: dòng chuyển gen *cry1Ab*.

Bảng 2. Đặc điểm kiểu hình của các dòng mía chuyển gen và nguyên bản trồng trong vườn ươm

Thời gian trồng (ngày)	Dòng mía	Chiều cao trung bình thân (cm)	Đường kính trung bình thân (mm)	Số lá	Chiều dài trung bình lá (cm)	Chiều rộng trung bình lá (mm)
Ngày bắt đầu	NB	3,6	1,1	4,0	8,2	2,1
	V1	3,5	1,2	4,0	8,6	1,9
	V2	3,6	1,3	4,0	8,8	1,8
	V3	3,5	1,2	4,0	9,0	2,0
	V4	3,5	1,2	4,0	8,9	1,9
	NB	8,2	1,7	4,0	19,8	3,4
	V1	7,8	1,7	4,0	20,0	3,4
	V2	7,8	1,7	4,0	19,7	3,4
	V3	8,0	1,7	4,0	19,8	3,4
	V4	7,8	1,7	4,0	19,4	3,3
30	NB	18,9	3,3	6,0	35,3	6,8
	V1	19,0	3,3	6,0	34,3	6,7
	V2	19,0	3,3	6,0	35,3	6,9
	V3	18,9	3,4	6,0	34,6	6,9
	V4	19,2	3,4	6,0	36,0	6,9
60	NB	18,9	3,3	6,0	35,3	6,8
	V1	19,0	3,3	6,0	34,3	6,7
	V2	19,0	3,3	6,0	35,3	6,9
	V3	18,9	3,4	6,0	34,6	6,9
	V4	19,2	3,4	6,0	36,0	6,9



Hình 7. Cây mía chuyển gen và đối chứng trồng trong vườn ươm ở các thời điểm khác nhau

Ghi chú: A: sau 1 tháng; B: sau 2 tháng. NB: cây nguyên bản. V1, V2: dòng chuyển gen V1, V2

4. KẾT LUẬN

- Ba dòng mía chuyển gen với chủng *A. tumefaciens* mang plasmid pCAMBIA3301-Cry1Ab là V1, V2, V3 và một dòng mía chuyển gen với chủng mang plasmid pCRY1B-1Ab là V4 được chọn lọc có khả năng kháng PPT 3 mg/l.

- Các dòng V1, V2, V3 mang cấu trúc biểu hiện gen *cry1Ab* và gen *bar*; dòng V4 mang cấu trúc biểu hiện gen *cry1B-cry1Ab* và gen *bar*. Đây là các dòng độc lập khác nhau, chỉ mang một bản gen chuyển trong bộ gen.

- Các dòng V1, V2, V3 có biểu hiện gen *cry1Ab* và dòng V4 có biểu hiện gen *cry1B-cry1Ab* trong điều kiện nuôi cấy *in vitro* cũng như *ex vitro*.

- Các dòng chuyển gen V1, V2, V3, V4 phát triển tốt trong điều kiện vườn ươm, có các đặc điểm hình thái của thân, lá, tương tự cây nguyên bản.

LỜI CẢM ƠN

Các tác giả chân thành cảm ơn Bộ Khoa học và Công nghệ / Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam đã tài trợ kinh phí thực hiện công trình này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Phan Tường Lộc, Hoàng Văn Dương, Mai Trường, Lê Tấn Đức, Trần Thị Ngọc Hà, Văn Đức Thành,

Phạm Đức Trí, Nguyễn Thị Thanh, Nguyễn Hữu Hồ (2012). Bước đầu chuyển gen *Bt* vào cây mía (*Saccharum officinarum* L.). Tạp chí Sinh học, 34:170-179.

Arencibia A.D., Vaquez R.I., Prieto D., Tellez P., Carmona E.R., Coego A., Hernandez L., de La Riva G.A., Housein G.S. (1997). Transgenic sugarcane plants resistant to stem borer attack. Mol. Breed., 3: 247-255.

Arvinth S., Arun S., Selvakesavan R. K., Srikanth J., Mukunthan N., Ananda Kumar P., Premachandran M. N., Subramonian N. (2010). Genetic transformation and pyramiding of aprotinin-expressing sugarcane with *cry1Ab* for shoot borer (*Chilo infuscatellus*) resistance. Plant Cell Rep., 29: 383-395.

Arvinth S., Selvakesavan R.K., Subramonian N., Premachandran M.N. (2009). Transmission and expression of transgenes in progeny of sugarcane clones with *cry1Ab* and aprotinin genes, Sug. Tech., 11 (3): 290-295.

Bohorova N., Frutos R., Royer M., Estanol P., Pacheco M., Rascon Q., Mclean S., Hoisington D. (2001). Novel synthetic *Bacillus thuringiensis cry1B* gene and the *cry1B-cry1Ab* translational fusion confer resistance to southwestern corn borer, sugarcane borer and fall armyworm in transgenic tropical maize". Theor. A. Gen, 103: 817-826.

Braga D.P.V., Arrigoni E.D.P., Silvia-Filho M.C., Ulian E.C. (2003). Expression of the *Cry1Ab* protein in genetically modified sugarcane for the control of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera:Crambidae). J. New Seeds, 5: 209-222.

Casali N., Preston A. (2003). Methods in molecular Biology. *E.coli* plasmid vector. Methods and applications. Humana Press, 235: 316.

- Christou P., Capell T., Kohli A., Gatehouse J.A., Gatehouse A.M.R. (2006). Recent developments and future prospects in insect pest control in transgenic crops. *TRENDS in Plant Science*, 11 (6): 302-308.
- De Maagd R.A., Bravo A., Crickmore N. (2001). How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *TRENDS in Genetics*, 17 (4): 193-199.
- Enriquez-Obregon G. A., Vazquez-Padron I.R., Prieto-Samsonov L.D., De la Riva A.G., Selman-Housein G. (1998). Herbicide-resistant sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Planta*, 206: 20-27.
- Envirologix Inc. (2012). Lateral Flow QuickStix™ Strip Kit.
- Fauconnier R. (1993). Sugar cane, Macmillan Press Ltd, London, UK.
- GE Healthcare (2006). Amersham ECL Direct Nucleic Acid Labelling And Detection Systems
- Ho N.H., Baisakh N., Oliva N, Datta K, Frutos R, Datta S.K. (2006). Translational fusion hybrid bt genes confer resistance against yellow stem borer in transgenic elite vietnamese rice (*Oryza sativa* L.) Cultivars. *Crop Sci.*, 46: 781-789.
- Kim S., Kim C., Li W., Kim T., Li Y., Zaidi M.A., Altosaar I. (2008). Inheritance and field performance of transgenic Korean *Bt* rice lines resistant to rice yellow stem borer. *Euphytica*, 164: 829-839.
- Santosa D.A., Hendroko R., Farouk A., Greiner R. (2004). A rapid and highly efficient method for transformation of sugarcane callus. *Mol. Biotechnol.*, 28(2): 113-9.
- Schnepf H.E., Crickmore N., Van Rie N., Dereclus J., Baum J., Feitelson J., Zeigler D.R., Dean D.H. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 62: 775-806.
- Valderrama A.M., Velasquez N., Rodriguez E., Zapata A., Zaidi M.A., Altosaar I., Arango R. (2007). Resistance to *Tecia solanivora* (Lepidoptera : Gelechiidae) in three transgenic Andean varieties of potato expressing *Bacillus thuringiensis CryIAc* protein. *J. Econ. Entomol.*, 100: 172-179.