

# TẠO CHỌN GIỐNG ĐẬU TƯƠNG BIẾN ĐỔI GEN KHÁNG SÂU Ở VIỆT NAM

Trần Thị Cúc Hòa<sup>1</sup>

## SUMMARY

### Breeding of GM soybean resistant to pests in Vietnam

This study aimed at developing transgenic soybean varieties resistant to insects to help increasing the yield and production of soybean in Vietnam. We used the vector pPTN791 which contained 2 T - DNA of which 1 T - DNA carried the gene *soycry1Ac* for insect resistance and 1 T - DNA carried the selectable marker gene *bar*. Transformation method using cotyledonary nodes infected with *Agrobacterium tumefaciens* was applied to Vietnamese variety MTĐ176 and 2 introduced varieties, Maverick, Williams 82. High transformation efficiency that was achieved in this study helped producing a large number of T0 and T1 lines confirmed by Southern blot analysis. By using the vector containing 2 separate T - DNA, the segregation between the gene *soycry1Ac* and the gene *bar* occurred right in T1 generation facilitating the selection T1 lines which carried only the gene *soycry1Ac*. The transgenic lines carrying the gene *soycry1Ac* were selected in subsequent generations. The insect feeding test showed that the transgenic lines had significantly higher resistance as compared to the non - transformed varieties offering a high opportunity to develop the first Vietnam transgenic soybean varieties for production.

**Key words:** *Agrobacterium tumefaciens*, *Glycine max*, insect resistance, transgenic varieties, soybean.

## I. MỞ ĐẦU<sup>1</sup>

Với sự phát triển của công nghệ sinh học, diện tích cây trồng biến đổi gen trên thế giới ngày càng tăng, lên đến 134 triệu ha trong năm 2009. Đậu tương [*Glycine max* (L.) Merr.] biến đổi gen chiếm diện tích lớn nhất trong tổng diện tích cây biến đổi gen với diện tích 76 triệu ha, chiếm 57% diện tích cây biến đổi gen và 77% tổng diện tích đậu tương toàn cầu (90 triệu ha). Ở Việt Nam, đậu tương là cây thực phẩm quan trọng, diện tích gia tăng từ 120 nghìn ha năm 1995 lên 200 nghìn ha năm 2009, với năng suất tương ứng tăng từ 1 tấn/ha lên 1,4 tấn/ha. Năng suất đậu tương hiện nay ở nước ta thấp hơn bình quân thế giới.

Tăng sản lượng đậu tương sản xuất trong nước là yêu cầu cấp thiết vì hàng năm nước ta phải nhập khẩu một khối lượng đậu tương lớn. Trong sản xuất đậu tương, sâu hại là một trong các yếu tố hạn chế năng suất chính, vì vậy việc

tạo chọn giống đậu tương biến đổi gen có tính kháng sâu cao sẽ không những giúp tăng năng suất mà còn giảm chi phí do giảm lượng thuốc trừ sâu. Theo mục tiêu này, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu tạo chọn giống đậu tương biến đổi gen kháng sâu để ứng dụng vào sản xuất ở Việt Nam.

## II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 1. Plasmid và chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*

Plasmid pPTN791 chứa 2 T - DNA riêng biệt, trong đó 1 T - DNA mang gen kháng sâu *soycry1Ac* và 1 T - DNA mang gen đánh dấu chọn lọc *bar* (hình 1). Plasmid pPTN791 sau khi được kiểm tra bằng cách cắt với enzyme giới hạn *XbaI*, *HindIII*+*SacI* được biến nạp vào *Agrobacterium tumefaciens* chủng EHA101 (Hood và *ctv.*, 1986).

<sup>1</sup> Viện Lúa Đồng bằng sông Cửu Long.



Hình 1. Plasmid pPTN791 (13590 bp) chứa 2 T - DNA, một T - DNA mang gen đánh dấu bar, một T - DNA mang gen kháng sâu, soyCry1Ac (LB: bờ trái, RB: bờ phải)

## 2. Giống đậu tương, phương pháp chuyển nạp và chọn lọc

Giống đậu tương dùng chuyển nạp gen kháng sâu gồm giống đậu tương Việt Nam, MTĐ176 và 2 giống nhập nội, Maverick và Williams 82. Phương pháp nuôi cấy *A. tumefaciens* và lây nhiễm nốt lá mầm với *A. tumefaciens*, chọn lọc bằng glufosinate và tái sinh cây được thực hiện theo quy trình của Trần Thị Cúc Hòa (2008a, 2008b).

Cây chuyển nạp gen sơ khởi T0 được thanh lọc bằng bôi thuốc diệt cỏ Liberty trên lá theo phương pháp của Trần Thị Cúc Hòa, 2008c để chọn cây kháng Liberty trồng trong nhà lưới.

## 3. Phân tích PCR và Southern blot

DNA được trích từ lá dựa theo phương pháp của Dellaporta và CTV. (1983). Các dòng biến đổi gen kháng thuốc diệt cỏ Liberty được chọn để phân tích sự hiện của gen bar bằng PCR. Cặp mồi cho gen bar: Mồi 1 (Forward) 5' - GAA GTC CAG CTG CCA GAA AC - 3' và mồi 2 (Reverse) 5' - GAC GAC CTC GTC CGT CTG - 3'.

Phân tích Southern blot được thực hiện để xác định sự gắn của gen bar hoặc gen soyCry1Ac vào nhiễm sắc thể của cây biến đổi gen. Sử dụng phương pháp đánh dấu bằng DIG và phân tích Southern blot cơ bản dựa theo Wünn và CTV. (1996) với vài cải tiến cho cây đậu tương.

## 4. Thử nghiệm tính kháng sâu

Các dòng T2 và 12 dòng T3, T5 biến đổi gen và giống đối chứng (MTĐ176 và Maverick) được đánh giá tính kháng sâu bằng phương pháp thả sâu theo phương pháp của Walker và CTV. (2000). Sâu bắt đầu được thả khi cây đậu tương được 35 ngày tuổi. Mỗi đợt thả 10 sâu xanh da

láng tuổi 2 - 3, các đợt thả sâu cách nhau 2 ngày. Tổng cộng có 4 đợt thả sâu. Tỷ lệ lá bị sâu ăn được đánh giá sau 7, 14, 21 và 28 ngày sau khi bắt đầu thả sâu. Thí nghiệm được bố trí theo kiểu khối hoàn toàn ngẫu nhiên. Tỷ lệ lá bị sâu ăn trung bình trên các cá thể thuộc mỗi dòng đậu được chuyển đổi bằng công thức  $\arcsin \times \sqrt{\text{phần trăm}}$ . Sự khác biệt giữa các dòng được xác định phép thử Duncan. Chương trình SPSS được ứng dụng trong phân tích thống kê.

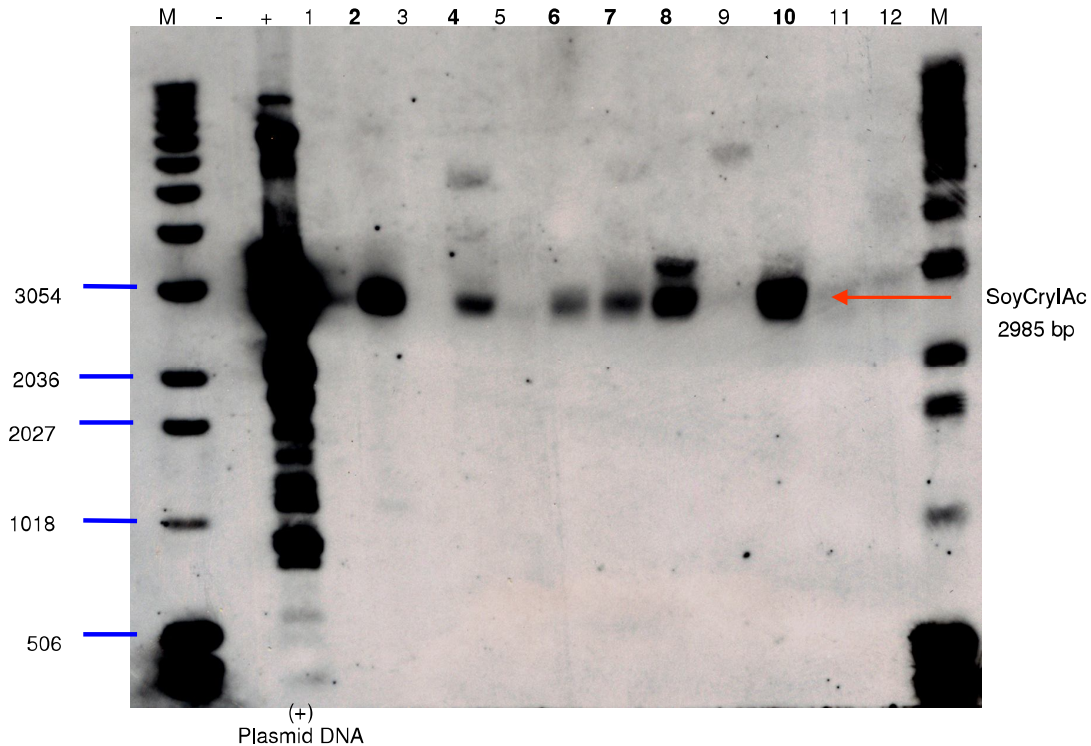
## III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 1. Tạo chọn dòng T0

Phương pháp chuyển nạp gen chúng tôi thực hiện đã đạt hiệu quả cao trong tạo ra các dòng đậu tương T0 biến đổi gen. Từ 3020 mẫu lây nhiễm đã tái sinh được 64 dòng T0 sau khi qua chọn lọc bằng glufosinate. Phân tích Southern blot ghi nhận 43/64 dòng T0 mang gen bar và trong số 43 dòng mang gen bar có 34 dòng đồng thời mang gen soyCry1Ac. Như vậy, hiệu quả chuyển nạp gen đạt 43/3020 hay 1,4%, đây là tỷ lệ cao đối với cây đậu tương vốn đáp ứng thấp đối chuyển nạp gen.

Hình 2 trình bày một trong các kết quả của phân tích Southern blot khẳng định sự hiện diện của gen soyCry1Ac (băng 2985 bp), kết quả này cho thấy 6/12 dòng T0 (dòng số 2, 4, 6, 7, 8 và 10) mang gen soyCry1Ac.

Hai gen bar và soyCry1Ac nằm trên T - DNA khác nhau nên được chuyển nạp vào cây một cách độc lập, tuy nhiên hiện tượng đồng chuyển nạp xảy ra, trong nghiên cứu của chúng tôi, tỷ lệ đồng chuyển nạp là 34/43 hay 79%. Các dòng T0 mang gen bar và soyCry1Ac được chọn để trồng ra dòng T1.



Hình 2. Phân tích Southern blot các dòng đậu tương T0 giống Maverick

DNA được cắt đoạn bằng *HindIII* và *SacI*. Màng được lai với DNA có mang gen *soycryIac*. DIG. Mũi tên chỉ chiều dài 2985 bp mang gen *soycryIac*

M: Thang đánh dấu, -: Đối chứng âm, +: Plasmid DNA

1: HS24 - 5, 2: HS24 - 8, 3: HS24 - 10, 4: HS25 - 1, 5: HS25 - 5, 6: HS25 - 6, 7: HS25 - 9, 8: HS25 - 10, 9: HS25 - 11, 10: HS25 - 17, 11: HS25 - 18, 12: HS26 - 1

## 2. Tạo chọn dòng T1

Hạt cây T0 (mang gen *bar* và gen *soycryIac*) được trồng để cho ra cây T1. Tổng số dòng T1 được phân tích là 201 dòng từ 18 dòng T0 độc lập. Kết quả phân tích Southern blot của 201 dòng T1 được trình bày ở bảng 1.

Kết quả phân tích Southern blot cho thấy:

- 14 dòng T0 (số thứ tự từ 1 đến 14 trong bảng 1) cho 164 dòng T1 có phân ly đối với 2 gen biến nạp *bar* và *soycryIac*, trong đó 68 dòng mang cả gen *bar* và *soycryIac*, 38 dòng mang gen *bar*, 12 dòng mang gen *soycryIac*, 46 dòng không mang gen nào. Như vậy ngay từ thế hệ T1 đã có sự phân ly gen *bar* khỏi gen *soycryIac* và có thể thu nhận ngay cây chuyển gen chỉ mang gen *soycryIac* mà không mang gen đánh dấu chọn lọc *bar*. Tỷ lệ phân ly gen biến nạp ngay ở thế hệ T1 là 7,3% (12/164). Đây là

một ưu điểm khi dùng vector mang 2 T - DNA vì có thể loại được gen đánh dấu chọn lọc ra khỏi cây biến đổi gen.

- 2 dòng T0 (số thứ tự 15 và 16) cho 22 dòng T1 mang cả mang cả gen *bar* và *soycryIac* (hai gen không phân ly).

- 2 dòng T0 (số thứ tự 17 và 18) cho 15 dòng T1 không có mang gen *bar* và cũng không mang gen *soycryIac*.

Tính tổng cộng trong 201 dòng T1 có 12 dòng mang gen *soycryIac*, 39 dòng mang gen *bar*, 90 dòng mang cả 2 gen *bar* và *soycryIac* và 60 dòng không mang gen nào.

Bằng thử nghiệm tính kháng thuốc trừ cỏ Liberty trên các dòng T1 kết quả thu được 129 dòng kháng Liberty, phân tích Southern blot cho thấy các dòng này đều mang gen *bar*.

Bảng 1. Kết quả phân tích Southern blot các dòng T1 chuyển nạp gen với vector pPTN791

TT	Tên giống	Dòng T0 mang 2 gen <i>bar</i> và <i>soycry1Ac</i>	Số dòng T1 (để phân tích bằng Southern blot)	Số dòng T1 kháng Liberty	Kết quả phân tích Southern blot các dòng T1 (số dòng)			
					<i>bar</i> <sup>+</sup>	<i>soy</i> <sup>+</sup>	<i>bar</i> <sup>-</sup> <i>soy</i> <sup>-</sup>	<i>bar</i> <sup>+</sup> <i>soy</i> <sup>+</sup>
1	MAVERICK	HS 22 - 01	7	2	2	0	5	0
2	MAVERICK	HS 22 - 05	11	5	0	0	6	5
3	MAVERICK	HS 22 - 13	12	8	0	0	4	8
4	MAVERICK	HS 23 - 04	10	7	0	0	3	7
5	MAVERICK	HS 23 - 06	17	11	11	0	6	0
6	MAVERICK	HS 25 - 10	12	8	0	0	4	8
7	MAVERICK	HS 40 - 01	3	3	3	0	0	0
8	MAVERICK	HS 40 - 04	3	2	2	0	1	0
9	MTĐ176	H3 - 01a	12	8	0	0	4	8
10	MTĐ176	H5 - 01	13	10	1	3	0	9
11	MTĐ176	H6 - 1a	19	16	3	3	0	13
12	MTĐ176	H6 - 1b	14	6	0	3	5	6
13	MTĐ176	H9 - 01	24	17	17	0	7	0
14	W82	HW4 - 01	7	4	0	3	0	4
15	MAVERICK	HS 21 - 05	10	10	0	0	0	10
16	MAVERICK	HS 25 - 01	12	12	0	0	0	12
17	MAVERICK	HS 24 - 01	12	0	0	0	12	0
18	W82	P 1 - 1	3	0	0	0	3	0
	<b>Tổng số</b>	<b>18</b>	<b>201</b>	<b>129</b>	<b>39</b>	<b>12</b>	<b>60</b>	<b>90</b>

K/N: Số dòng kháng Liberty/số dòng nhiễm Liberty; *soy*<sup>+</sup>: Có gen *soycry1Ac*, không có gen *bar*; *Bar*<sup>+</sup>: Có gen *bar*, không có gen *soycry1Ac*; *Bar*<sup>-</sup> *soy*<sup>-</sup>: Không có gen *bar*, không có gen *soycry1Ac*; *Bar*<sup>+</sup>*soy*<sup>+</sup>: Có gen *bar*, có gen *soycry1Ac*; W82: Williams 82.

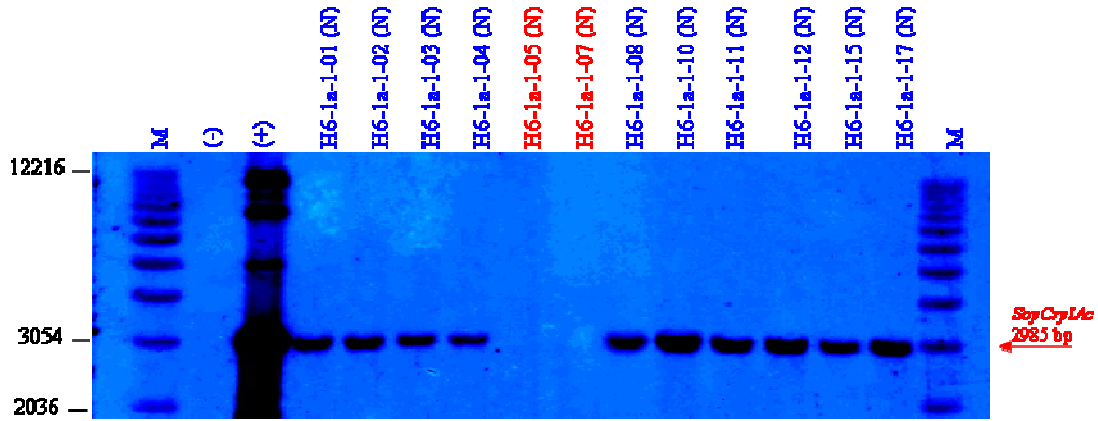
### 3. Tạo chọn dòng T2, T3

Kết quả phân tích Southern blot của 2 quần thể T2 của giống MTĐ176 ghi nhận:

Trong 12 dòng T2 từ dòng T1 H6 - 1a - 01 (dòng T1 này mang gen *soycry1Ac* nhưng không mang gen *bar*) có 10 dòng mang gen *soycry1Ac* và 2 dòng không mang gen *soycry1Ac* (2 dòng này bị loại bỏ) (hình 3). Trong 17 dòng T2 từ dòng T1 H6 - 1a - 09 (dòng T1 này mang gen *soycry1Ac* nhưng không mang gen *bar*), tất cả đều mang gen *soycry1Ac*.

Tổng số từ 2 dòng T1 trên đã tạo chọn được 27 dòng biến đổi gen T2 chỉ mang gen *soycry1Ac*, các dòng này đang ở thế hệ T3.

Tính kháng Liberty của của 221 dòng T2 phát triển từ 13 dòng T1 (mang gen *bar* và *soycry1Ac*) cho thấy, 163 dòng kháng và 58 dòng nhiễm. Trong khi tính kháng Liberty của của 128 dòng T2 phát triển từ 7 dòng T1 khác (mang gen *bar* và *soycry1Ac*) cho thấy các dòng đều kháng Liberty. Các dòng T2 kháng Liberty được kiểm tra sự hiện diện của gen *bar* và *soycry1Ac* bằng phân tích Southern blot.



Hình 3. Phân tích Southern blot các dòng T2 nhiễm Liberty từ dòng T1 (H6 - 1a - 1/MTĐ176) ghi nhận 10/12 dòng mang gen *soycryIAc*.

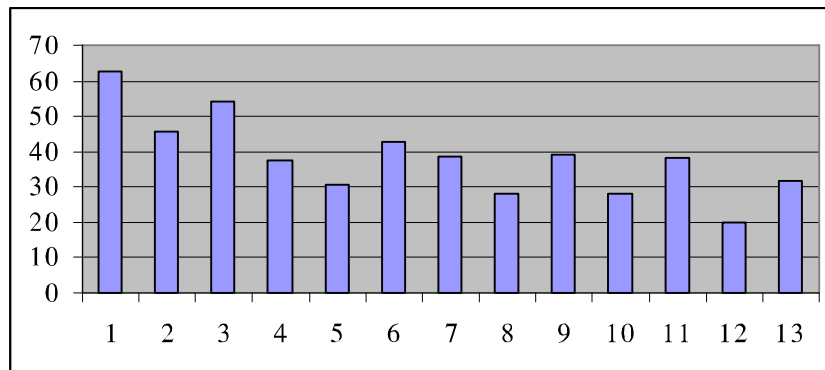
DNA được cắt đoạn bằng *HindIII* và *SacI*. Màng được lai với DNA có mang gen *soycryIAc*. Mũi tên chỉ kích thước 2985 bp của gen *soycryIAc*; (+) Plasmid DNA

#### 4. Đánh giá tính kháng sâu

Các dòng chuyển nạp gen T2 được đánh giá tính kháng sâu để chọn các dòng kháng cao bằng cách cho sâu xanh da láng nở ăn lá đậu tương của cây T2 chuyển gen và cây đối chứng (không chuyển gen). Kết quả ghi nhận trong 45 dòng T2 của giống MTĐ176, có 7 dòng gây trọng lượng sâu giảm đáng kể so với đối chứng; Trong 17 dòng T2 của giống Maverick, có 3 dòng gây trọng lượng sâu giảm đáng kể so với đối chứng. Đánh

giá 12 dòng (1 dòng T3, 11 dòng T5) của MTĐ176 cho thấy các dòng biến đổi gen có tỷ lệ lá bị thiệt hại do sâu ăn lá (sâu xanh da láng) thấp hơn có ý nghĩa so với đối chứng (MTĐ176) (hình 5). Dòng biến đổi gen số 12 (T5/4H6 - 1a - 9 - 135 - 6) có 19,9% lá bị thiệt hại so với 62,6% lá bị thiệt hại của giống MTĐ176 (Hình 4). Kết quả thử nghiệm thả sâu trên giống đối chứng và dòng biến đổi gen MTĐ176, Maverick được ghi nhận ở hình 5 và 6.

% lá thiệt hại



Hình 4. Tỷ lệ (%) lá bị sâu ăn trung bình của các dòng sâu sau 28 ngày thả sâu

Ký hiệu: 1: MTĐ176 Đối chứng; Từ 2 - 13: Dòng biến đổi gen;

2: T3/T2H5 - 1 - 11 - 20; 3: T3/T2H5 - 1 - 11 - 38; 4: T5/T4H6 - 1a - 9 - 5 - 16 - 8; 5: T5/T4H6 - 1a - 9 - 5 - 16 - 12; 6: T5/T4H6 - 1a - 9 - 10 - 2 - 5; 7: T5/T4H6 - 1a - 9 - 13 - 1 - 9; 8: T5/T4H6 - 1a - 9 - 13 - 1 - 12; 9: T5/T4H6 - 1a - 9 - 13 - 1 - 20;

**10:** T5/T4H6 - 1a - 9 - 13 - 3 - 2; **11:** T5 T4H6 - 1a - 9 - 13 - 3 - 18; **12:** T5/4H6 - 1a - 9 - 135 - 6; **13:** T5/T4H6 - 1a - 9 - 13 - 11 - 19



#### IV. KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu cho thấy hệ thống chuyển nạp gen mà chúng tôi sử dụng có hiệu quả cao trong tạo ra các dòng đậu tương biến đổi gen mang gen kháng sâu *soycryIAc*, trong đó có các dòng chỉ mang gen kháng sâu và không mang gen đánh dấu chọn lọc *bar*. Thử nghiệm tính kháng sâu cho thấy các dòng biến đổi gen biểu hiện tính kháng sâu cao hơn một cách có ý nghĩa so với giống không biến đổi gen. Các dòng đậu tương biến đổi gen kháng sâu *đầu tiên được tạo ra tại Việt Nam* có thể đưa vào khảo nghiệm vào năm 2012.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

Dellaporta S.L, Wood J. and Hicks J.B. (1983), A plant miniprep: Version II, Plant Mol. Biol. Repr. 1: 19 - 21.

Hood E.E, Helmer G.L, Fraley R.T and Chilton M.D. (1986), The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 helper is encoded in a region of pTiBo542 outside of T - DNA. J. Bacteriol, 168: 1291 - 1301.

Trần Thị Cúc Hòa (2008a), Tối ưu hóa quy trình chuyển nạp gen đậu tương bằng cải tiến phương pháp lây

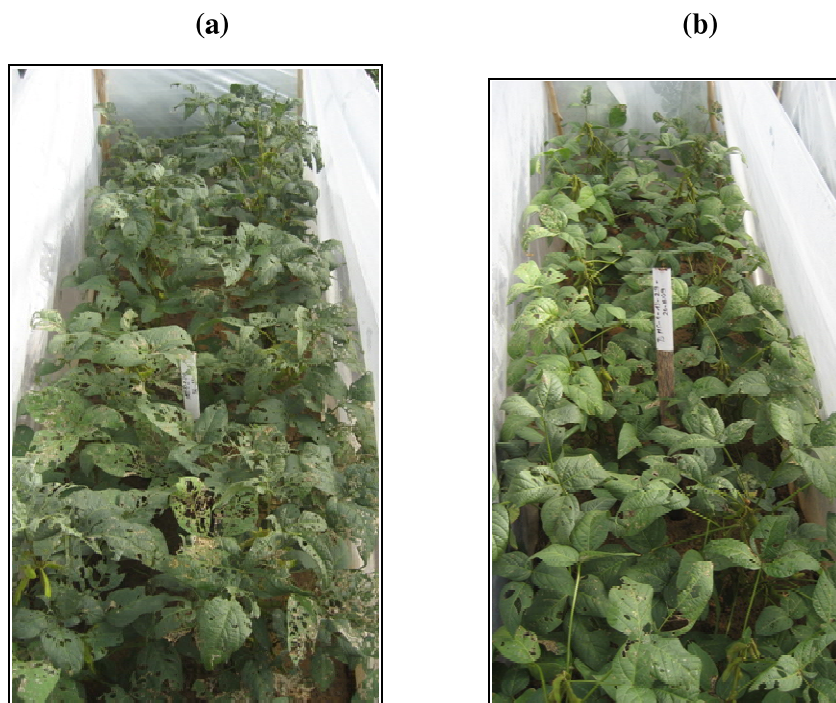
nhầm với *Agrobacterium tumefaciens*, Tạp chí Nông nghiệp & Phát triển nông thôn 9:8 - 11.

Trần Thị Cúc Hòa (2008b), Nghiên cứu tạo dòng đậu tương biến đổi gen tại Việt Nam bằng phương pháp nốt lá mầm qua trung gian *Agrobacterium tumefaciens*, Kỷ yếu Hội nghị Khoa học toàn quốc lần thứ IV hóa sinh và sinh học phân tử phục vụ nông, sinh, y học và công nghiệp thực phẩm, trang 301 - 304, NXB. Khoa học và Kỹ thuật.

Trần Thị Cúc Hòa (2008c), Hiệu quả tạo dòng đậu tương biến đổi gen từ giống MTĐ176, HL202, Maverick và Williams 82 bằng phương pháp nốt lá mầm qua trung gian *Agrobacterium tumefaciens*, Tạp chí Nông nghiệp & Phát triển Nông thôn 1:14 - 19.

Walker D.R, All J.N, McPherson R.M, Boerma H.R and Parrott W.A. (2000), Field evaluation of soybean engineered with a synthetic cryIAc transgene for resistance to corn earworm, soybean looper and velvetbean caterpillar (Lepidoptera: Noctuidae), and lesser cornstalk borer (Lepidoptera: Pyralidae). J Econ Entomol 93:613 - 622.

Wünn J, Klöti A, Burhardt P.K, Ghosh Biswas G.C, Launis K, Iglesias V.A and Potrykus I. (1996), Transgenic indica breeding line IR58 expressing a synthesis cryIA(b) gene from *Bacillus thuringiensis* provides effective insect pest control. Bio/Technology 14: 171 - 176.



Hình 5. Kết quả ghi nhận sau 28 ngày thả sâu ở giống đối chứng MTĐ176 (a) và dòng đậu tương biến đổi gen từ giống MTĐ176 (b)

(c)

(d)



*Hình 6. Kết quả ghi nhận sau 28 ngày thả sâu ở giống đôi chứng Maverick (c) và dòng đậu tương biến đổi gen từ giống Maverick (d)*