

CHUYỂN GEN CODA MÃ HÓA CHOLINE OXIDASE VÀO CÂY XOAN TA (*Melia azedarach* L.) TĂNG CƯỜNG KHẢ NĂNG CHỊU HẠN

Bùi Văn Thắng¹, Lê Văn Sơn² và Chu Hoàng Hà²

¹ThS. Viện Công nghệ sinh học Lâm nghiệp, Trường Đại học Lâm nghiệp

²TS. Viện Công nghệ Sinh học, Viện Hàn Lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

Những yếu tố bất lợi từ môi trường như hạn, mặn, úng, nhiệt độ cao thường làm mất cân bằng về áp suất thẩm thấu gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến sinh trưởng, phát triển và năng suất cây trồng. Tạo cây trồng biến đổi gen cải thiện khả năng chống chịu với các điều kiện bất lợi của môi trường đang là một hướng nghiên cứu trọng tâm của công nghệ sinh học thực vật hiện nay. Gen *codA* tổng hợp nhân tạo mã hóa cho choline oxidase tham gia vào sinh tổng hợp glycine betaine đã được chuyển thành công vào cây Xoan ta thông qua *Agrobacterium tumefaciens*. Chồi và cây Xoan ta chuyển gen *codA* nhận được trên môi trường chọn lọc bổ sung kanamycin được khẳng định bằng PCR nhân gen *codA*. Đánh giá 68 dòng Xoan ta chuyển gen ở điều kiện hạn nhân tạo thu được 5 dòng chống chịu hạn tốt hơn so với dòng đối chứng không chuyển gen. Hàm lượng glycine betaine tích lũy trong lá của các dòng Xoan ta chuyển từ 2,1 – 4,5 mM/g lá tươi cao hơn nhiều so với dòng Xoan ta đối chứng không chuyển gen (0,7 mM/g lá tươi). Các dòng Xoan ta chuyển gen cải thiện được khả năng chống chịu với điều kiện khô hạn. Đây là cơ sở để ứng dụng công nghệ chuyển gen vào cải thiện khả năng chịu hạn ở cây lâm nghiệp nói chung và cây Xoan ta nói riêng.

Từ khóa: Chịu hạn, chuyển gen, gen *codA*, glycine betaine, Xoan ta

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Những yếu tố bất lợi từ môi trường như hạn, mặn, úng, nhiệt độ cao thường làm mất cân bằng về áp suất thẩm thấu gây ảnh hưởng nghiêm trọng đến sinh trưởng, phát triển và năng suất cây trồng (Boyer, 1982; Wang et al., 2001). Một trong những phản ứng thường gặp nhất khi cây chịu các điều kiện bất lợi về nước là tăng cường tổng hợp và tích lũy các chất hòa tan tương thích như các loại đường tan, glycine betaine, proline, v.v. để duy trì áp suất thẩm thấu (Hasegawa, Bressan, 2000). Glycine betaine (GB) được biết đến là một trong những chất đóng vai trò quan trọng trong quá trình điều chỉnh áp suất thẩm thấu nội bào khi thực vật sống trong các điều kiện môi trường bất lợi (Khan et al., 2009). GB là chất hòa tan tương thích hiệu quả nhất và được tìm thấy trong một phạm vi rộng ở các loài động vật, vi khuẩn và một số loài thực vật hạt kín chịu hạn mặn và mặn (Rhodes, Hanson, 1993; Chen, Murata, 2002). GB bảo vệ cây bằng cách duy trì cân bằng nước giữa tế bào với môi trường, ổn định

các đại phân tử, điều chỉnh và duy trì màng thylacoid, đảm bảo hiệu quả quang hợp dưới điều kiện khô hạn và nồng độ muối cao (Yang et al., 2003). Trong tự nhiên, rau bina, ngô, củ cải đường và lúa mạch, nhanh chóng tích lũy GB khi cây bị tác động bởi môi trường hạn mặn, nồng độ muối cao và nhiệt độ thấp (Bohnert et al., 1995).

Đến nay, các con đường liên quan đến sinh tổng hợp GB ở sinh vật đã được làm sáng tỏ. Ở một số loài thực vật bậc cao GB được tổng hợp từ choline thông qua hai phản ứng liên tiếp. Đầu tiên choline được chuyển thành betaine aldehyde nhờ sự xúc tác của choline monooxygenase và tiếp theo betaine aldehyde được chuyển hóa thành GB dưới xúc tác của betaine aldehyde dehydrogenase (Rathinasbapathi et al., 1997). Trong khi đó, con đường sinh tổng hợp GB ở vi khuẩn *Arthrobacter globiformis* lại rất đơn giản, từ choline chuyển hóa thành sản phẩm trực tiếp là GB chỉ cần xúc tác bởi choline oxidase (Ikuta et al., 1977). Gen *codA* mã hóa choline oxidase phân lập từ *Arthrobacter globiformis*, đã

chuyển thành công vào nhiều loài cây trồng và chứng minh cây chuyển gen tăng cường được khả năng chống chịu các điều kiện môi trường bất lợi như cây *Arabidopsis thaliana* chuyển gen *codA* tăng cường khả năng chịu lạnh, nhiệt và băng giá (Alia et al., 1998; Sakamoto, Murata, 2000), cây cải bẹ, bạch đàn, cà chua chuyển gen *codA* cũng tăng cường khả năng chịu mặn và oxy hóa (Prasad et al., 2000; Ahmad et al., 2008; Yu et al., 2009).

Việt Nam là một trong những quốc gia bị tác động mạnh mẽ của việc biến đổi khí hậu. Hạn hán và đất nhiễm mặn đang ngày một gia tăng, đây sẽ là một trong những nguyên nhân chính làm giảm năng suất và chất lượng cây trồng. Việc nghiên cứu tạo ra các giống cây trồng nông lâm nghiệp có khả năng chịu hạn và mặn cao đang trở thành một trong những hướng nghiên cứu trọng tâm hiện nay. Các nghiên cứu về chuyển gen vào cây trồng nâng cao tính chống chịu điều kiện môi trường bất lợi mới chủ yếu tập trung vào các loài cây nông nghiệp; đối với các loài cây lâm nghiệp còn rất hạn chế. Xoan ta là loài cây gỗ lớn, nhiều ưu điểm: gỗ nhẹ, có vân thớ đẹp, khá bền, khó bị mối mọt, nên được dùng trong xây dựng, trang trí nội thất và điêu khắc, lá làm phân xanh, hạt ép lấy dầu. Vì vậy, cây Xoan ta được đánh giá là một trong những loài cây trồng quan trọng trong chiến lược phát triển

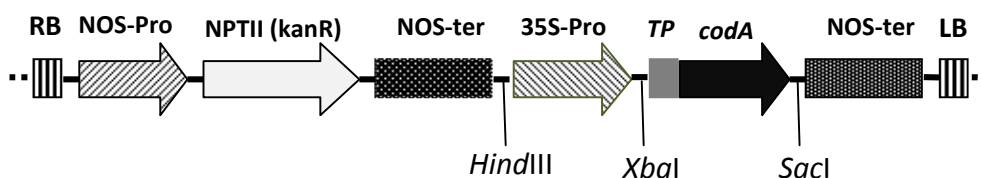
lâm nghiệp ở Việt Nam. Với giá trị kinh tế của cây Xoan ta, việc ứng dụng công nghệ chuyển gen để cải thiện giống là cần thiết. Trong bài báo này, tác giả trình bày kết quả nghiên cứu chuyển gen *codA* vào cây Xoan ta và đánh giá khả năng chịu hạn của cây Xoan ta chuyển gen. Kết quả là cơ sở để tạo giống cây trồng lâm nghiệp chuyển gen tăng cường tính chống chịu khô hạn.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu

Hạt giống Xoan ta được Viện Công nghệ sinh học Lâm nghiệp, Đại học Lâm nghiệp cung cấp.

Chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 mang vector chuyển gen nhị thể pBI121 chứa gen *codA* mã hóa cho choline oxidase (gen *codA* tổng hợp nhân tạo dựa trên trình tự có mã số AY304485 trong Ngân hàng gen NCBI, đặt hãng Epoch Life Science, Inc, Hoa Kỳ tổng hợp) và gen *nptII* mã hóa cho neomycin phosphotrans-ferase II. Gen *codA* được thiết kế thêm vào đầu 5' một đoạn DNA mã hóa cho đoạn peptide vận chuyển vào lục lạp - TP (transit peptide sequences of the Rubisco small subunit of tobacco). Sơ đồ vector chuyển gen pBI121 chứa gen *codA* và *nptII* như Hình 01.



Hình 01. Sơ đồ vector chuyển gen pBI121 chứa gen *codA* và *nptII*

2. Phương pháp nghiên cứu

2.1. Phương pháp tạo cây Xoan ta chuyển gen

Quy trình chuyển gen vào cây Xoan ta thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* được tiến hành như sau: Hạt Xoan

ta được khử trùng (theo phương pháp của Bùi Văn Thắng và đồng tác giả, 2007), cấy lên môi trường này mầm MS bổ sung 3% sucrose và 7,5 g/l agar. Sau 2 tuần, thân mầm của cây Xoan ta tái sinh từ hạt được cắt thành những đoạn nhỏ có kích thước 1 cm, những đoạn thân

này được nhiễm với dịch huyền phù vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* mang vector chuyển gen (nồng độ vi khuẩn $OD_{600} = 0,5$) trong 30 phút, mẫu được thấm khô và nuôi trên môi trường đồng nuôi cấy MS bổ sung 1 mg/l BAP + 0,2 mg/l NAA + 200 μ M acetosrington trong 48 giờ (nuôi trong tối). Sau thời gian đồng nuôi cấy, mẫu được rửa loại bỏ vi khuẩn bằng dung dịch cefotaxime 500 mg/l và cấy chuyển sang môi trường tái sinh chọn lọc SM: MS bổ sung 0,5 mg/l BAP + 0,1 mg/l kinetin + 150 mg/l kanamycin + 300 mg/l cefotaxime, sau 20-25 ngày nuôi cấy các chồi bắt đầu tái sinh. Chọn lọc các chồi có thân, lá màu xanh đậm cấy chuyển sang môi trường ra rễ R: MS + 0,3 mg/l IBA + 50 mg/l kanamycin. Cây Xoan ta chuyển gen sau khi ra rễ được chuyển ra trồng trong nhà lưới.

2.2. Phân tích sự có mặt của gen *codA* ở cây chuyển gen

DNA tổng số được tách từ lá xoan theo phương pháp của Xavier, Karine (2000). Sự có mặt của gen *codA* trong cây chuyển gen được kiểm tra bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu: F1: 5'-GCT CTA GAA TGG CAC AAA TTA ACA-3' và R1: 5'-CGA GCT CTC AAT TCA GAT CCT CTT C-3' nhân gen *codA* và đoạn TP có kích thước khoảng 1,9 kb theo chu trình nhiệt: 94°C/3 phút, 30 chu kỳ [94°C/1 phút, 50°C/50 giây, 72°C/1 phút 30 giây], 72°C/10 phút và kết thúc phản ứng ở 4°C. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng phương pháp điện di trên gel agarose 0,8%, nhuộm bằng ethidium bromide, soi dưới đèn UV và chụp ảnh.

2.3. Phân tích biểu hiện của gen *codA* ở mức độ phiên mã

RNA tổng số được tách từ các mẫu lá của cây chuyển gen bằng TRIzol (Invitrogen, Mỹ). Biểu hiện của gen *codA* ở mức độ phiên mã được kiểm tra bằng kỹ thuật RT-PCR, sử dụng bộ kit SuperScriptTM One-Step RT-PCR System with Platinum[®] Taq High Fidelity (Invitrogen, Hoa Kỳ) với cặp mồi PCR đặc

hiệu F2: 5'-GAC TAC ATT GTT GTT GGA GGT G-3' và R2: 5'-GTA GAA AGT ACG ACT TCG TTT CTA G-3' nhân một đoạn gen *codA* có kích thước 760 bp theo chu trình nhiệt: 94°C/3 phút, 30 chu kỳ [94°C/1 phút, 56°C/50 giây, 72°C/1 phút], 72°C/10 phút và kết thúc phản ứng ở 4°C.

2.4. Đánh giá tính chịu hạn của các dòng Xoan ta chuyển gen ở mức độ nhà lưới

Đánh giá nhanh khả năng chịu hạn của các dòng Xoan ta chuyển gen *codA* được tiến hành ở giai đoạn cây con (1 tháng tuổi). Các dòng Xoan ta chuyển gen và đối chứng không chuyển gen được xử lý khô hạn (không tưới nước), nuôi trong buồng sinh trưởng với điều kiện nhiệt độ $27 \pm 2^\circ\text{C}$, độ ẩm 60%, cường độ chiếu sáng 4.000–5.000 lux, thời gian chiếu sáng 14 h/ngày. Khả năng chịu hạn của các dòng cây Xoan ta chuyển gen được đánh giá thông qua hình thái và phân tích hàm lượng glycine betaine tích lũy. Phương pháp tách chiết và xác định hàm lượng glycine betaine trong lá cây Xoan ta được thực hiện theo Grieve và Grattan (1983).

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

1. Tạo các dòng cây Xoan ta chuyển gen *codA*

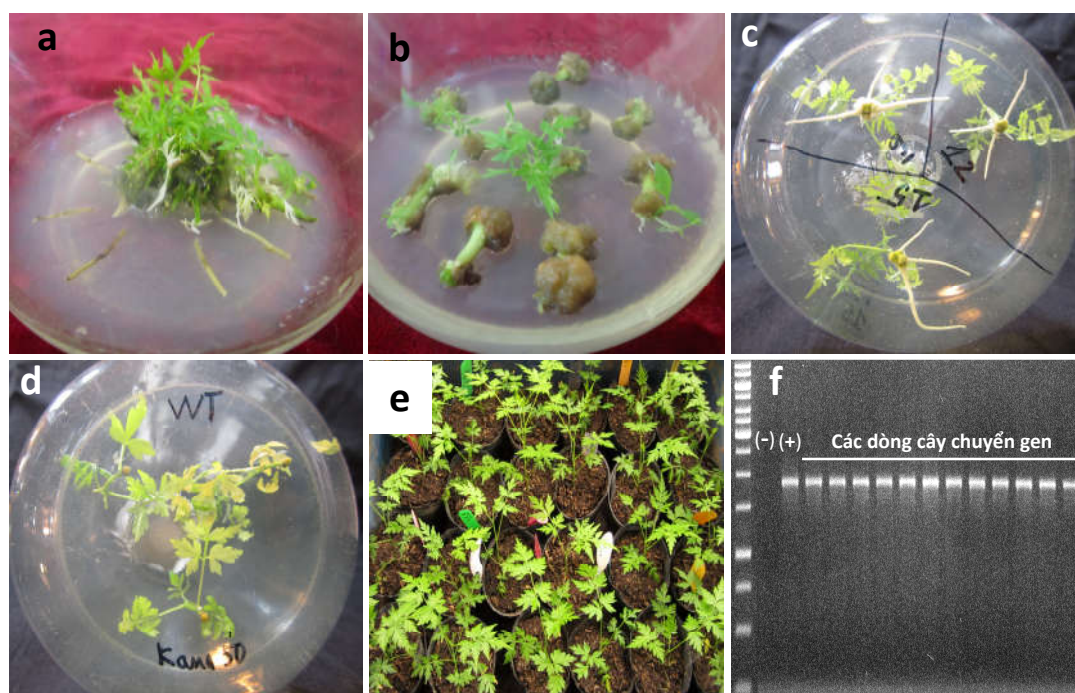
Thí nghiệm chuyển gen *codA* vào Xoan ta được chia làm 3 lô với tổng số mẫu biến nạp 448 đoạn thân mầm. Kết quả chuyển gen thu được trình bày ở bảng 01 cho thấy, với 448 thể nhận gen được xâm nhiễm và đồng nuôi cấy với chủng *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 mang vector chuyển gen pBI121 chứa gen *codA* sau 5 tuần nuôi cấy trên môi trường tái sinh chồi chọn lọc (MS + 0,5 mg/l BAP + 0,1 mg/l kinetin + 30 g/l sucrose + 8 g/l agar + 150 mg/l kanamycin + 300 mg/l cefotaxime) tái sinh được 197 chồi. Các chồi được cấy chuyển sang môi trường ra rễ chọn lọc (MS + 0,3mg/l IBA + 20 g/l sucrose + 8,0 g/l agar + 50 mg/l kanamycin), sau 3 tuần có 68 chồi ra rễ, chiếm 15,2% so với số mẫu biến

nạp. Theo các nghiên cứu công bố trước đây cho thấy các chồi Xoan ta ra rễ được trên môi trường chọn lọc 50 mg/l kanamycin là chồi chuyển gen (Bùi Văn Thắng et al., 2012). Các dòng cây Xoan ta chuyển gen này được chuyển ra trồng trong nhà lưới. Khi cây sinh trưởng bình thường (ra lá mới), lá của dòng cây Xoan ta chuyển gen và dòng cây đối chứng không chuyển gen (WT) được thu và tách chiết DNA

tổng số, sử dụng làm khuôn cho phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu nhân gen *codA*. Kết quả cho thấy, cả 68 dòng cây Xoan ta kiểm tra đều dương tính với phản ứng PCR, các dòng chuyển gen đều xuất hiện một băng DNA có kích thước 1,9 kb đúng với kích thước của đoạn gen *codA* chuyển vào Xoan ta. Điều này chứng tỏ các dòng Xoan ta này đã được chuyển cấu trúc gen *codA* (Hình 02f).

Bảng 01. Tổng hợp kết quả chuyển gen *codA* vào Xoan ta

Lô thí nghiệm	Số mẫu biến nạp	Số chồi/Môi trường SM 150 mg/l Kan	Số chồi ra rễ/Môi trường R 50 mg/l Kan	Số chồi dương tính với PCR
1	150	54	22	22
2	140	68	19	19
3	158	75	27	27
Tổng số	448	197	68	68



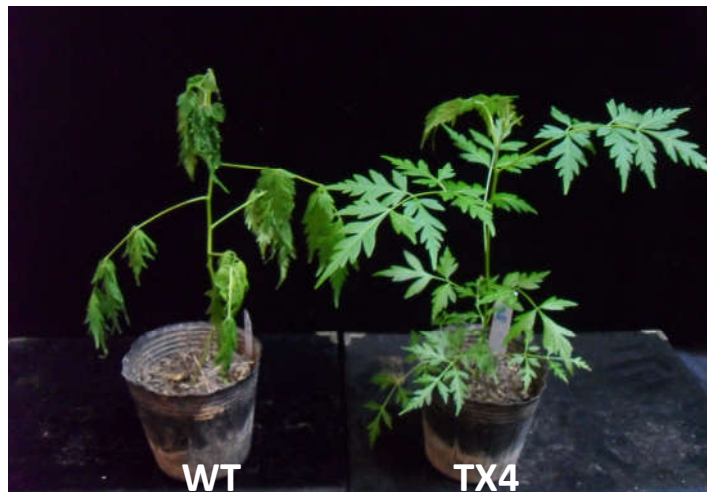
Hình 02. Các dòng cây Xoan ta chuyển gen *codA*

Ghi chú: Hình a và b: chồi chuyển gen trên môi trường tái sinh có 150 mg/l kanamycin; Hình c: chồi chuyển gen trên môi trường ra rễ có 50 mg/l kanamycin; Hình d: chồi không chuyển gen (WT) trên môi trường ra rễ có 50 mg/l kanamycin; Hình e: các dòng chuyển gen trồng ở nhà lưới; Hình f: PCR nhân gen *codA* từ các dòng chuyển gen.

2. Đánh giá khả năng chịu hạn của các dòng Xoan ta chuyển gen *codA*

Cả 68 dòng Xoan ta chuyển gen được chuyển ra trồng trong bầu đất. Cây 1 tháng tuổi được tiến hành xử lý hạn (không tưới nước). Sau 10 ngày xử lý hạn, các dòng cây Xoan ta chuyển gen và dòng cây đối chứng không chuyển gen (WT) có phản ứng khác nhau với điều kiện hạn; Trong 68 dòng chuyển gen xử lý hạn thu được 5 dòng (TX4, TX12, TX27, TX28 và TX54) có khả năng chịu hạn tốt nhất, cây sinh trưởng và phát triển hình thường trong điều kiện xử lý hạn 10 ngày, còn các dòng chuyển gen khác và dòng WT lá bị héo rũ,

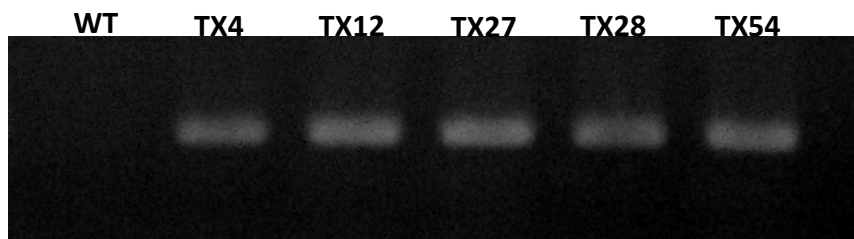
rụng và ngừng sinh trưởng (Hình 03). Đặc biệt, kéo dài thời gian xử lý hạn nhân tạo 20 ngày, 5 dòng chuyển gen (TX4, TX12, TX27, TX28 và TX54) vẫn sống nhưng sinh trưởng chậm lại so với cây trồng ở điều kiện bình thường. Ngược lại, các dòng chuyển gen khác và dòng WT bị chết. Các dòng cây Xoan ta chuyển gen *codA* sinh trưởng được trong điều kiện môi trường bị khô hạn có thể là do gen *codA* chuyển vào hoạt động sinh tổng hợp choline oxidase giúp cây tăng cường sinh tổng hợp glycine betaine, từ đó duy trì cân bằng nước giữa các tế bào và môi trường, ổn định các đại phân tử, duy trì hiệu quả quang hợp dưới điều kiện khô hạn.



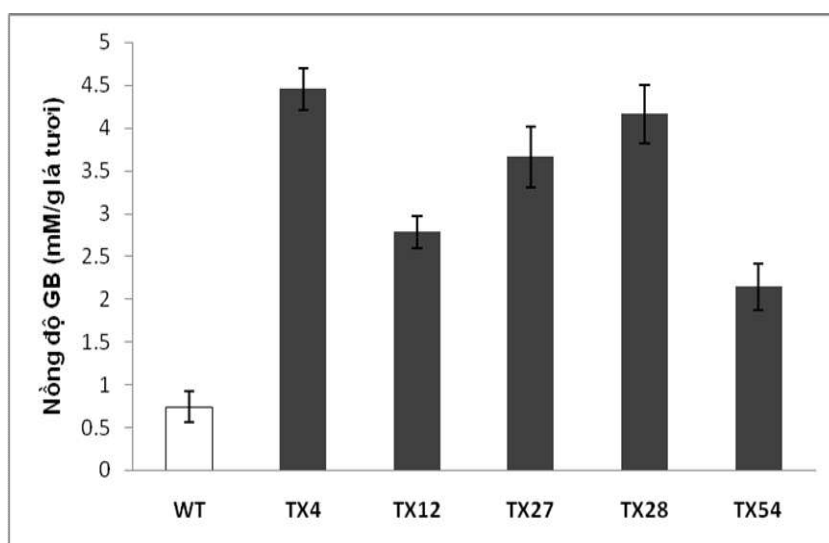
Hình 03. Dòng Xoan ta chuyển gen (TX4) và đối chứng (WT) sau xử lý hạn 10 ngày

Phân tích sự biểu hiện của gen *codA* ở mức độ phiên mã ở 5 dòng Xoan ta chuyển gen (TX4, TX12, TX27, TX28 và TX54) bằng kỹ thuật RT-PCR. Kết quả cho thấy cả 5 dòng chuyển gen *codA* dưới sự điều khiển của promoter 35S đều có sự biểu hiện mạnh ở mức độ mRNA (Hình 04). Đồng thời, đã xác định hàm lượng glycine betaine tích lũy trong lá của 5 dòng chuyển gen này và dòng WT sau xử lý hạn 10 ngày. Kết quả phân tích cho thấy, các dòng chuyển gen có sự tích lũy hàm lượng glycine betaine trong khoảng 2,1–4,5 mM/g lá tươi, cao hơn nhiều so với dòng đối chứng không chuyển gen (0,7 mM/g lá tươi) (Hình 05). Kết quả này hoàn toàn phù hợp với sự

biểu hiện về hình thái, về khả năng chịu khô hạn của các dòng Xoan ta chuyển gen và dòng đối chứng sau 10 ngày không tưới nước. Dòng TX4 có hàm lượng glycine betaine tích lũy cao nhất 4,5 mM/g, tiếp theo dòng TX28 là 4,2 mM/g, dòng TX27 là 3,7 mM/g, dòng TX12 là 2,8 mM/g và thấp nhất là dòng TX54 là 2,1 mM/g. Mặc dù giữa các dòng Xoan ta chuyển gen có sự tích lũy glycine betaine khác nhau nhưng lượng tích lũy đã đảm bảo cho các dòng chuyển gen cải thiện được khả năng chống chịu với điều kiện khô hạn. Kết quả tương tự cũng đã được công bố ở cây hồng, ngô, bông chuyển gen (Huang et al., 2000; Quan et al., 2004; Lv et al., 2007).



Hình 04. Sự biểu hiện của gen *codA* trong các dòng cây Xoan ta chuyển gen bằng phản ứng RT-PCR. TX4, TX12, TX27, TX28, TX54 là dòng chuyển gen và WT là dòng đối chứng không chuyển gen.



Hình 05. Nồng độ GB tích lũy trong lá của các dòng Xoan ta chuyển gen và đối chứng

Glycine betaine tích lũy ở nồng độ cao không gây cản trở chức năng của tế bào chất đồng thời có tác dụng đảm bảo tính ổn định cấu trúc và chức năng của các đại phân tử. Mức độ tích lũy glycine betaine tương quan với khả năng chống chịu điều kiện bất lợi (Yang et al., 2003). Nhiều loài cây trồng chuyển gen *codA* tăng cường sinh tổng hợp và tích lũy glycine betaine trong tế bào chống chịu tốt hơn với điều kiện môi trường bất lợi (hạn, mặn, lạnh, băng giá, nhiệt và oxy hóa) cũng đã được báo cáo như cây *Arabidopsis thaliana* (Alia et al., 1998; Sakamoto, Murata, 2000), cây hồng (Huang et al., 2000), lúa (Sawahel, 2003), cải bẹ (Waditee et al., 2005), cà chua (Park et al., 2007; Ahmad et al., 2008), bạch đàn (Yu et al., 2009). Tương tự, kết quả nghiên cứu chuyển gen *codA* vào Xoan ta cho thấy các dòng chuyển gen tích lũy glycine betaine cao hơn so với đối chứng không chuyển

gen và các dòng chuyển gen cải thiện được khả năng chống chịu với điều kiện khô hạn.

IV. KẾT LUẬN

Đã chuyển thành công gen *codA* mã hóa cho choline oxidase tham gia sinh tổng hợp glycine betaine vào cây Xoan ta. Đánh giá 68 dòng Xoan ta chuyển gen *codA* ở điều kiện hạn nhân tạo thu được 5 dòng cây chống chịu hạn tốt, là các dòng TX4, TX12, TX27, TX28 và TX54. Hàm lượng glycine betaine tích lũy trong lá của các dòng Xoan ta chuyển gen (2,1–4,5 mM/g lá tươi) cao hơn nhiều so với dòng đối chứng không chuyển gen (0,7 mM/g lá tươi) dẫn đến các dòng Xoan ta chuyển gen có khả năng chịu hạn tốt hơn so với cây đối chứng không chuyển gen. Đây là cơ sở để ứng dụng công nghệ chuyển gen vào cải thiện khả năng chịu hạn ở cây lâm nghiệp nói chung và cây Xoan ta nói riêng.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Ahmad R, Kim MD, Back KH, Kim HS, Lee HS, Kwon SY, Murata N, Chung WI, Kwak SS, 2008. Stress-induced expression of choline oxidase in potato plant chloroplasts confers enhanced tolerance to oxidative, salt, and drought stresses. *Plant Cell Rep*, 27: 687-698.
2. Alia, Hayashi H, Sakamoto A, Murata N, 1998. Enhancement of the tolerance of *Arabidopsis* to high temperatures by genetic engineering of the synthesis of glycinebetaine. *Plant J*, 16: 155-161.
3. Bohnert HJ, Nelson DE, Jensen RG, 1995. Adaptations to environmental stresses. *Plant Cell*, 7: 1099-1111.
4. Boyer JS, 1982. Plant productivity and environment. *Science*, 218: 443-448.
5. Bùi Văn Thắng, Hà Văn Huân, Nguyễn Văn Việt, Hồ Văn Giảng, 2007. Nghiên cứu hệ thống tái sinh cây Xoan ta (*Melia azedarach* L.) phục vụ cho chuyển gen. Hội nghị Khoa học toàn quốc về Nghiên cứu cơ bản trong khoa học sự sống. Nxb. KH&KT: 815-819.
6. Bùi Văn Thắng, Phạm Thị Hằng, Đỗ Xuân Đồng, Lê Văn Sơn và Chu Hoàng Hà 2012. Nghiên cứu hoạt động của promoter rd29A cảm ứng hạn ở cây xoan ta (*Melia azedarach* L.) chuyển gen. Tạp chí KHCN, 3B: 504-510.
7. Chen THH, Murata N, 2002. Enhancement of tolerance to abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. *Curr Opin Plant Biol*, 5: 250-257.
8. Grieve CM, Grattan SR, 1983. Rapid assay of determination of water-soluble quaternary-amino compounds. *Plant Soil*, 70: 303-307.
9. Hasegawa PM, and Bressan RA, 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 51: 463-99.
10. Huang J, Hirji R, Adam L, Rozwadowski KL, Hammerlindl JK, Keller WA, Selvaraj G, 2000. Genetic engineering of glycinebetaine production toward enhancing stress tolerance in plants: metabolic limitations. *Plant Physiol*, 122: 747-756.
11. Ikuta S, Mamura S, Misaki H, Horiuti Y, 1977. Purification and characterization of choline oxidase from *Arthrobacter globiformis*. *J Biochem*, 82: 1741-1749.
12. Khan MS, Yu X, Kikuchi A, Asahina M, Watanabe KN, 2009. Genetic engineering of glycine betaine biosynthesis to enhance abiotic stress tolerance in plants. *Plant Biotechnology*, 26: 125-134.
13. Lv S, Young A, Zhang K, Wang L, Zhang J, 2007. Increase of glycinebetaine synthesis improves drought tolerance in cotton. *Mol Breed*, 20: 233-248.
14. Park EJ, Jeknic' Z, Pino MT, Murata N, Chen THH, 2007. Glycinebetaine accumulation is more effective in chloroplasts than in the cytosol for protecting transgenic tomato plants against abiotic stress. *Plant Cell Environ*, 30: 994-1005.
15. Prasad KVS, Sharmila P, Kumar PA, Pardha Saradhi P, 2000. Transformation of *Brassica juncea* (L.) Czern with a bacterial *codA* gene enhances its tolerance to salt stress. *Mol Breed*, 6: 489-499.
16. Quan R, Shang M, Zhang H, Zhao Y, Zhang J, 2004. Engineering of enhanced glycinebetaine synthesis improves drought tolerance in maize. *Plant Biotechnol J*, 2: 477-486.
17. Rathinasapathi B, Burnet M, Russell BL, Gage DA, Liao PC, Nye GJ, Scott P, Golbeck JH, Hanson AD, 1997. Choline monooxygenase, an unusual iron-sulfur enzyme catalyzing the first step of glycine betaine synthesis in plants: Prosthetic group characterization and cDNA cloning. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94: 3454-3458.
18. Rhodes D, Hanson AD, 1993. Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 44: 357-384.
20. Sakamoto A, Murata N, 2000. Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in plants: current status and implications for enhancement of stress tolerance. *J Exp Bot*, 51: 81-88.
21. Sawahel W, 2003. Improved performance of transgenic glycinebetaine accumulating rice plants under drought stress. *Biologia Plantarum*, 47: 39-44.
22. Waditee R, Bhuiyan MN, Rai V, Aoki K, Tanaka Y, Hibino T, 2005. Genes for direct methylation of glycine provide high levels of glycinebetaine and abiotic stress tolerance in *Synechococcus* and *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102: 1318-1323.
23. Wang WX, Vinocur B, Shoseyov O, Altman A, 2001. Biotechnology of plant osmotic stress tolerance. Physiological and molecular considerations. *Acta Hort*, 560: 285-292.
24. Xavier JL, Karine L, 2000. A rapid method for detection of plant genomic instability using unanchored-Microsatellite. *Plant Mol Biol Rep* 18: 283a-283g.
25. Yang WJ, Rich PJ, Axtell JD, Wood KV, Bonham CC, Ejeta G, Mickelbart MV, Rhodes D, 2003. Genotypic variation for glycine betaine in sorghum, *Crop Sci*, 43: 162-169.
26. Yu X, Kikuchi A, Matsunaga E, Morishita Y, Nanto K, et al., 2009. Establishment of the evaluation system of salt tolerance on transgenic woody plants in the special netted house. *Plant Biotechnol* 26: 135-141.

**TRANSFORMATION OF *CODA* GENE ENCODING CHOLINE OXIDASE
INTO *Melia azedarach* L. ENHANCES DROUGHT TOLERANCE**

Bui Van Thang, Le Van Son, Chu Hoang Ha

SUMMARY

Drought is one of the environmental stress factors that affects seriously to the growth and development of plants. Recently, application of transgenic plants which are tolerant to the environmental stress conditions is a new approach in plant biotechnology. The *codA* gene coding for choline oxidase, an enzyme entering in the biosynthesis of glycinebetaine, was used to transform into *Melia azedarach* L. through *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. The putative transformed shoots obtained on selected medium supplying 150 mg/L kanamycin were successfully confirmed by PCR analysis using the specific *codA* primer pair. The results of drought treatment showed that among 68 transgenic lines, five of these were grown better than that of the wild type. The accumulation of glycine betaine in leaves ($2.1 - 4.5 \text{ mM g}^{-1} \text{ fw}$) of these transgenic lines was higher than that of the wild type ($0.7 \text{ mM g}^{-1} \text{ fw}$). These results demonstrated that the introduction of a biosynthetic pathway for glycinebetaine into *Melia azedarach* L. enhanced significantly their drought tolerance.

Key words: *Coda gene, drought tolerance, glycine betaine, Melia azedarach L., transformation*

Người phản biện: TS. Lâm Đại Nhân

Ngày nhận bài: 30/4/2013

Ngày phản biện: 24/5/2013

Ngày quyết định đăng: 07/6/2013