ẢNH HƯỞNG CỦA MỘT SỐ NHÂN TỐ TỚI HIỆU SUẤT CHUYỂN GEN *GmMYB12A* Ở CÂY ĐẬU TƯƠNG

Nguyễn Văn Phong[2], HongDi. Chen[1], ChangYuan. Ji[1], Wei. Teng[1], JingWen. Li[1], Ying. Wang[1], XiaoWei. Li[1], Waqas Ahmad, Phạm Văn Điển[2], QingYu. Wang[1]

[1]*Học viện Khoa học thực vật, Đại học Cát Lâm*

[2]*Viện Công nghệ sinh học Lâm nghiệp, trường Đại học Lâm nghiệp Việt Nam*

TÓM TẮT

Cây trồng biến đổi gen nói chung và Đậu tương biến đổi gen nói riêng trong những năm gần đây ở nước ta đã được quan tâm và có nhiều nghiên cứu bước đầu thành công. Gen *GmMYB12A* là gen có liên quan tới hàm lượng isoflavone cao. Trong nghiên cứu chuyển gen này vào giống Đậu tương Williams 82, chúng tôi đã chỉ ra ngưỡng nồng độ vi khuẩn OD_{600} = 0,7 - 0,9 biến nạp gen *GmMYB12A* là tốt nhất; thời gian biến nạp bằng phương pháp hút chân không phù hợp là 15 phút, tại nồng độ 200 µM AS có tỉ lệ biểu hiện gen cao 81, 05%, ở nồng độ 400 mg/L L-Cys có tỉ lệ biểu hiện gen *GmMYB12A* cao nhất (79,05%) trong các thí nghiệm mà tác giả đã nghiên cứu. Sau khi kiểm tra sự có mặt của gen *GmMYB12A* bằng phương pháp CTAB ở thế hệ T_0; QuickStix ở thế hệ T_1, Southern blot và Western blot ở thế hệ T_2 , hiệu quả chuyển gen đạt được là 9,78%. Nó đã làm tăng hàm lượng isoflavone trong hạt Đậu tương Williams 82 khi dùng phương pháp high-performance liquid chromatographic (HPLC) phân tích xác định, có thể tăng tới 0,7 µg/mg so với Đậu tương không chuyển gen.

Từ khóa: ***GmMYB12A, half-seed explants , chuyển gen Đậu tương, nhân giống thực vật, Williams 82.***

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Công nghệ sinh học đang được ứng dụng vào trong rất nhiều các lĩnh vực của cuộc sống. Trong lâm - nông nghiệp, nó mang lại hiệu quả thiết thực ngày càng thỏa mãn nhu cầu của con người mang tính bền vững, ảnh hưởng sâu rộng tới lĩnh vực trồng trọt như: giống cây trồng, bảo vệ thực vật và kỹ thuật canh tác. Trong đó, công nghệ gen mở ra một giai đoạn mới trong lĩnh vực giống cây trồng. Nó cho phép xác định các gen, các đặc tính mong muốn, có thể cải tiến, nhân và tổng hợp chúng, chuyển nạp vào cơ thể sinh vật muốn cải tạo, tạo nên giống mới mang đặc tính mới có định hướng, rút ngắn thời gian tạo giống. Quá trình chuyển gen gồm nhiều bước khác nhau với mục đích đưa được các gen quan tâm vào hệ gen của tế bào thực vật, để thu nhận được các protein tái tổ hợp biểu hiện các tính trạng mong muốn. Trong các bước của quy trình chuyển gen ngoài đối tượng cây chuyển gen và phương pháp chuyển gen thì việc xác định vector và gen chuyển là những yếu tố quan trọng làm cơ sở cho quá trình chuyển gen thành công (KH.Thanh, 2006; NĐ.Thành, 2003; Hinchee và nnc, 1988; Hansen và nnc, 1992; Mankin và nnc, 2007). Để tối ưu quy trình chuyển gen đưa vào ứng dụng trong thực tiễn thì nghiên cứu các nhân tố ảnh hưởng tới hiệu quả biến nạp gen là hết sức quan trọng.

Đậu tương (*Glycine max* (L.) Merrill) là cây trồng quan trọng trên thế giới, là nguồn cung cấp protein cho con người. Tính đến năm 2009, diện tích Đậu tương chuyển gen được đưa ra trồng đại trà đạt khoảng 170 triệu ha (Clive James, 2010). Hiện nay Đậu tương là cây trồng chuyển gen được trồng nhiều nhất trên thế giới, năm 2013 cây trồng chuyển gen đã được trồng ở 29 quốc gia (Zhang và nnc, 2013). Việc chọn và tạo được các giống Đậu tương mang lại những chất dinh dưỡng đáp ứng nhu cầu của con người là một nhu cầu cần thiết trong sản xuất và được xem như định hướng nghiên cứu phát triển cây Đậu tương ở Việt Nam. Gen *GmMYB12A* là gen liên quan đến hàm lượng isoflavone cao. Isoflavone trong Đậu tương là một lớp các chất chuyển hóa thứ cấp, ảnh hưởng tới phân chia tế bào, hình thành tế bào mới, *GmMYB12A* được phân lập trong cây Đậu tương Cát Lâm 32, đăng ký trong ngân hàng

gen mã số: JF510467, nó có tiềm năng lớn cung cấp dinh dưỡng giúp sức khỏe con người (Xiao và nnc, 2013; Li và nnc, 2012). Trong các nghiên cứu gần đây hạt Đậu tương là nguồn đạm quý giá từ thiên nhiên, không chỉ ngon mà còn rất giàu dinh dưỡng. Trong đó, isoflavone là nhân tố chủ yếu làm nên đặc tính đó, nó có khả năng phòng chống những bệnh: Loãng xương, tăng huyết áp, tim mạch, chứng tăng cholesterol trong máu, một số ung thư và các triệu chứng thời kỳ mãn kinh của phụ nữ ...(P.Mai, 2010; Bob và nnc, 2008). Các dẫn chất Flavonoid là chất chống ô xy hóa, do có khả năng dập tắt các gốc tự do như OH, ROO (là yếu tố gây biến dị, hủy hoại tế bào, ung thư, tăng nhanh sự lão hóa,...).

Xuất phát từ cơ sở trên, sau khi phân lập được gen chuyển *GmMYB12A*. Chúng tôi tiến hành: nghiên cứu một số nhân tố ảnh hưởng tới hiệu quả quy trình chuyển gen thông qua *Agrobacterium tumefaciens* nhằm tăng hiệu quả biến nạp gen *GmMYB12A*.

II. VẬT LIỆU, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

2.1.1. Vật liệu nguồn giống

Thí nghiệm sử dụng hạt chín Williams 82 do phòng Lab 703, Đại học Cát Lâm cung cấp.

2.1.2. Vật liệu di truyền

Thí nghiệm sử dụng chủng vi khuẩn EHA 105 mang cấu trúc vector pBI121, plasmid pGBKT7 mang gen *GmMYB12A* có gắn gen GUS được điều khiển bởi promoter CaMV35S, gen chọn lọc ở thực vật là gen *bar* (Hình 1).

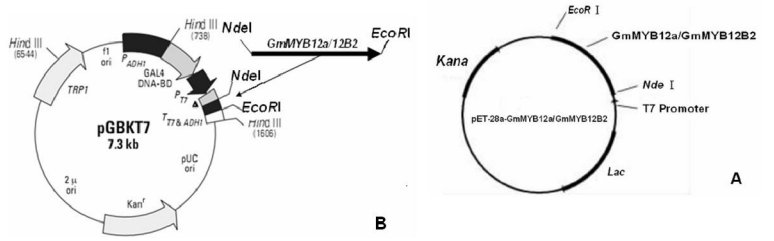
Genetic Material: Digestion sites

GmMYB12A-RT-F:

5′- ATGGAGAGAAGTAGTGAAGAG-3′

GmMYB12A-RT-R:

5′- TCAGAACAAGTCATGATGAGC-3



Hình 1. ***Cấu trúc pGBKT7***

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Chuẩn bị chủng vi khuẩn và môi trường lây nhiễm: Sau khi phân lập được gen *MYB12A*, chủng vi khuẩn EHA105 mang cấu trúc vector pBI121 được nuôi cấy trên môi trường YEP có chứa kanamycin 100 mg/L, rifampicin 100 mg/L ở 28^0C.

Chuẩn bị hạt và mẫu lây nhiễm: Hạt giống Đậu tương William 82 được khử trùng bằng khí Cl_2 trong 16 giờ (Cl_2 được tạo ra từ dung dịch gồm 52 ml H_20 + 44 ml NaOCl 5% + 5ml HCL). Ngâm hạt trong nước cất vô trùng trong 13 giờ, sau đó dùng phương pháp nửa hạt có cải tiến (half-seed) của Magie M.Paz, năm 2006; NT. Dũng, 2010 để tạo mẫu lây nhiễm.

2.2.1. Nghiên cứu ảnh hưởng mật độ quang của dịch khuẩn Agrobacterium (OD) tới hiệu quả chuyển gen

Mật độ vi khuẩn *Agrobacterium* cao thường gây chết tế bào thực vật, làm giảm khả năng tái sinh của các tế bào sau khi biến nạp, dẫn tới giảm tần số chuyển gen bền vững. Tuy nhiên, mật độ vi khuẩn lây nhiễm cao là cần thiết đối với chuyển gen vào các loài, các mẫu mô khó, tần số chuyển gen có thể được cải thiện bằng cách lây nhiễm thời gian ngắn, rửa mẫu sau khi lây nhiễm hoặc bổ sung các chất kìm hãm vi khuẩn vào môi trường đồng nuôi cấy (TTC.Hoa và nnc, 2008; Hai và nnc, 2007; Olhoft và nnc, 2001; Paz và nnc, 2004). Để có được sự phối hợp giữa chuyển T-DNA và chuyển gen bền vững thì các điều kiện lây nhiễm, đồng nuôi cấy phải thích hợp cho việc chuyển T-DNA và tái sinh cây chuyển gen. Ngoài ra còn có ảnh hưởng của kiểu gen, dạng mô đích, mô sẹo phôi hóa, phôi non mới tách,

huyền phù tế bào, nhiệt độ... (Nguyễn Đức Thành, 2003; Parrot, 1989; Meurer và nnc, 1998; Margie và nnc, 2004; NV.Phong, 2009).

Chủng vi khuẩn EHA105 mang cấu trúc vector pBI121 được nuôi cấy trên môi trường YEP đặc có chứa kanamycin 100 mg/L, rifampicin 100 mg/L ở 37^0C trong 30 giờ, tiếp tục chuyển khuẩn lạc đơn đã mang gen *GmMYB12A* sang nuôi cấy ở môi trường YEP không có Agar, lắc 180 rpm ở 28^0C. Mật độ vi khuẩn được kiểm tra bằng máy đo OD_{600} của hãng BECKMAN COULTER. Bởi vì mật độ vi khuẩn ảnh hưởng tới số lượng vi khuẩn tiếp xúc với mẫu biến nạp do đó có thể ảnh hưởng tới tỉ lệ số vi khuẩn chuyển được đoạn T-DNA vào tế bào thực vật. Chúng tôi nghiên cứu mật độ của vi khuẩn *Agrobacterium* ở các ngưỡng sau: 0,5; 0,7; 0,9; 1,1; 1,3 dùng phương pháp hút chân không lây nhiễm 15 phút và sau thời gian đồng nuôi cấy là 5 ngày, các thí nghiệm của phần nuôi cây mô tế bào thực vật được thực hiện trong phòng nuôi cây với điều kiện nhiệt độ phòng 25^0C ± 2.

2.2.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của thời gian biến nạp đến hiệu quả chuyển gen GmMYB12A vào giống Đậu tương Williams 82

Phương pháp chuyển gen thấm lọc chân không cũng tương tự như phương pháp ngâm cụm hoa. Phương pháp này đã được áp dụng ở một số cây trồng, đặc biệt là cây hai lá mầm. Trong môi trường chân không, tế bào thực vật tiếp xúc với *Agrobacterium* tốt hơn. Người ta đã nhận được các cây Medicago truncatula (cây mô hình thuộc họ đậu) chuyển gen bền vững bằng phương pháp này (Tingay.S và nnc, 1997). Bên cạnh đó, ngày nay trên thế giới còn sử dụng các phương pháp biến nạp trực tiếp như: Biến nạp bằng súng bắn gen, biến nạp bằng hóa chất, biến nạp bằng sung điện (Sharma K.K và nnc, 2005; Meurer và nnc, 1998; Dai và nnc, 2001).

Mẫu sau khi xử lý, chuẩn bị cho biến nạp, được ngâm trong dung dịch huyền phù vi khuẩn, dùng máy hút chân không lây nhiễm với các khoảng thời gian: 5, 10, 15, 20 và 30 phút. Sau đó thấm khô mẫu bằng giấy thấm vô trùng. Chuyển mẫu sang môi trường nuôi cấy cộng sinh (thành phần môi trường phụ thuộc vào các thí nghiệm tái sinh, môi trường đồng nuôi cấy được ký hiệu là CCM). Nuôi cấy cộng sinh ở nhiệt độ 25^0C, trong 48 giờ (5 ngày). Phương thức thích hợp được xác định bằng hiệu quả biểu hiện gen *GmMYB12A* có gắn gen GUS, hàm lượng protein GUS được đo bằng cách sử dụng phương pháp Bradford sử dụng huỳnh quang và huỳnh quang phổ.

Thí nghiệm tiến hành đánh giá hiệu quả của thời gian khác nhau lây nhiễm dịch khuẩn, phương thức thích hợp được xác định bằng hiểu quả biểu hiện gen *GmMYB12A*

2.2.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ chất dẫn dụ Acetosyringon (AS) tới hiệu quả chuyển gen

Acetosyringon (AS) là một hợp chất của phenol được tiết ra tại vùng bị thương của cây. AS đóng vai trò dẫn dụ vi khuẩn *Agrobacterium* tới mô lây nhiễm và kích hoạt các gen vùng *vir* hoạt động để hoạt hóa cơ chế chuyển T-DNA vào tế bào thực vật. AS được bổ sung vào dịch vi khuẩn 1 - 2 giờ trước khi biến nạp.

Nửa hạt Đậu tương sau khi tách và gây tổn thương được lây nhiễm và nuôi cấy cộng sinh trên môi trường CCM có bổ sung Acetosyringone ở các nồng độ 0, 100, 200 và 300 µM. Chủng vi khuẩn được sử dụng với OD_{600}=0,8 để lây nhiễm. Nồng độ AS thích hợp được xác định bằng hiệu quả biểu hiện của gen *GmMYB12A* có gắn gen GUS.

2.2.4. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ chất L-Cystein tới hiệu quả biến nạp (chuyển) gen.

Thử nghiệm ảnh hưởng của L-Cystein ở các nồng độ 0; 200; 400; 600 và 800 mg/L. Nồng độ L-Cystein thích hợp được xác định bằng

hiệu quả biểu hiện của gen *GmMYB12A* có gắn gen GUS.

2.3. Quy trình tiến hành

Phương pháp chuyển gen thông qua phương pháp nửa hạt (half-seed) của Magie và nnc, 2006 có cải tiến.

2.3.1. Quan sát biểu hiện tạm thời của gen GUS

Mẫu nửa hạt Đậu tương sau khi đồng nuôi cấy 5 ngày, đem rửa với nước, rồi bỏ mẫu vào ống falcon 50 ml ngâm mẫu trong dung dịch X-gluc ở tủ 37^0C trong 48 h. Tiếp đó, rửa mẫu 4-5 lần với ethanol 96% với mục đích loại bỏ diệp lục của lá, sau đó quan sát và chụp ảnh mẫu. Mẫu được nhuộm để quan sát biểu hiện của gen GUS theo phương pháp của Jefferson và nnc (1987); Olhoft và nnc, 2003; Susan, 2002, hoá chất nhuộm là X-Gluc.

Tỉ lệ biểu hiện tạm thời ở đây được tính theo số đốm và vùng màu xanh chàm đặc trưng. Thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên 3 lần nhắc lại mỗi công thức theo dõi 6-10 đĩa, mỗi đĩa 7 mẫu của giống đậu Williams 82.

2.3.2. Phương pháp thu thập, xử lý đánh giá kết quả

Mẫu Đậu tương sau khi đồng nuôi cấy 5 ngày, các thí nghiệm được bố trí ngẫu nhiên hoàn toàn, nhắc lại 3 lần. Sau đó kết quả được thể hiện bằng các biểu phù hợp và sử dụng phần mềm Excel và SPSS15 để xử lý số liệu.

III. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

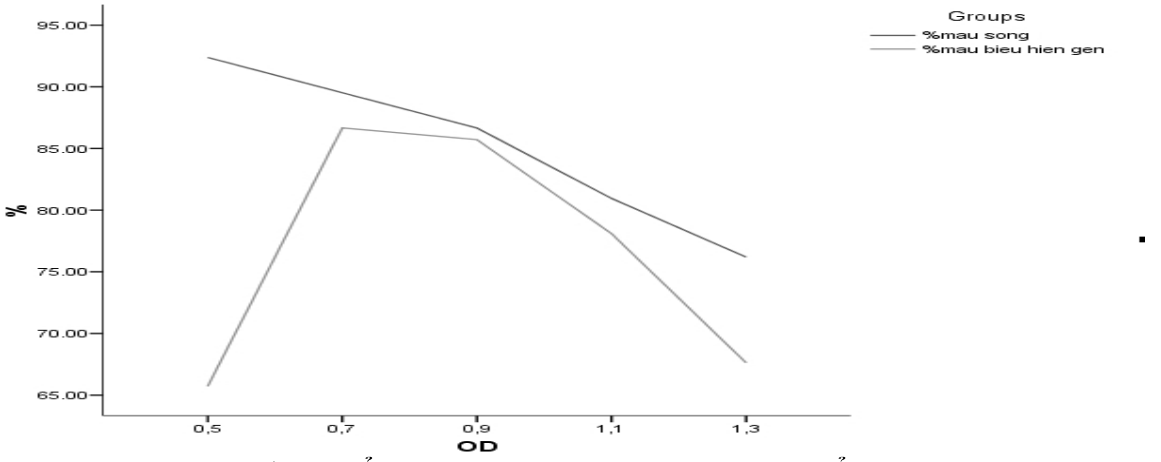
3.1. Ảnh hưởng mật độ quang của dịch khuẩn (OD) đến khả năng biểu hiện gen *GmMYB12A* có gắn gen GUS của giống đậu Williams 82

Một trong những yếu tố ảnh hưởng rất lớn đến hiệu quả biến nạp gen thông qua vi khuẩn *Agrobacterium* chính là mật độ của vi khuẩn khi lây nhiễm. Mật độ vi khuẩn thể hiện số tế bào vi khuẩn trong một đơn vị thể tích, khi lượng tế bào vi khuẩn quá thấp sẽ làm giảm tần số tiếp xúc với các mẫu thực vật do đó hiệu quả biến nạp không cao; ngược lại, khi lượng tế bào vi khuẩn quá cao sẽ ảnh hưởng tới sự phát triển của mẫu thực vật, thậm chí làm chết mẫu trong quá trình nuôi cấy. Mục đích của nghiên cứu này là xác định mật độ vi khuẩn (OD_{600}) thích hợp cho quá trình biến nạp để sự xâm nhiễm của vi khuẩn *Agrobacterium* đạt hiệu quả tốt nhất.

Đồng nuôi cấy mẫu sau lây nhiễm trên môi trường CCM trong 5 ngày. Kết quả thu được như ở bảng 1 và hình 2 với tổng số mẫu ứng với từng thí nghiệm là 115 mẫu.

Bảng 1. ***Ảnh hưởng mật độ quang của dịch khuẩn (OD)***

OD_{600}	Tổng số mẫu nghiên cứu	Tỷ lệ mẫu sống (%)	Số mẫu biểu hiện gen GUS	Hiệu quả biểu hiện gen (%)	Hiệu quả biến nạp gen đã kiểm tra sau thế hệ T_2 (%)
0,5	115	91,30	70	60,86	
0,7	115	86,96	95	82,61	9,78
0,9	115	85,21	93	80,87	
1,1	115	82,61	90	78,26	
1,3	115	78,26	83	72,17	



Hình 2. *Ảnh hưởng mật độ quang của dịch khuẩn (OD)*

Qua kết quả ở bảng 1 và hình 2 thấy rằng: mật độ vi khuẩn (OD) ảnh hưởng rõ rệt đến tần số chuyển gen cũng như tỷ lệ sống của mẫu. Khi theo dõi thí nghiệm chúng tôi thấy, OD dịch khuẩn quá thấp dẫn đến tần số biến nạp thấp do lượng khuẩn không đủ. Ở mật độ vi khuẩn $OD_{600} \leq 0,5$ tỷ lệ sống của mẫu là rất cao 91,30%, mẫu biến nạp hầu như không bị ảnh hưởng bởi nồng độ dịch khuẩn, tuy nhiên hiệu quả biểu hiện gen biến nạp vào mẫu thấp chỉ là 60,86%. Còn nếu OD quá cao sẽ gây chết mẫu nhiều, tỉ lệ mẫu sống ở $OD_{600} = 1,3$ là 78,26%, mà trong khi tần số biến nạp không cao là 72,17%. Tỷ lệ sống và tần số chuyển gen bắt đầu giảm mạnh khoảng $OD_{600} = \{1,1; 1,3\}$. Với tỷ lệ sống lần lượt là 82,61% và 78,26% và tần số biểu hiện gen chuyển tương ứng là 78,26% và 72,17%. Về hiệu quả biến nạp, ở ngưỡng nồng độ $OD_{600} = \{0,5\text{-}0,9\}$ hiệu quả biến nạp tăng dần từ 60,86 đến 80,87%.

Như vậy, OD_{600} dịch khuẩn thích hợp nhất cho quá trình chuyển gen Đậu tương giống William 82 dao động trong khoảng 0,7-0,9. Ở trong khoảng OD_{600} này, chúng tôi thu được tỷ lệ sống và tần số chuyển gen của mẫu cao. Kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu trước: C.A.Meurê và cộng sự, 1998 đã sử dụng chủng vi khuẩn EHA105 với mật độ OD=1,0 để lây nhiễm với nốt lá mầm của 28 giống Đậu tương khác nhau cho kết quả cao. Olhoft và D.A Somers, 2001, Olholf và nhóm nghiên cứu, 2003 đã sử dụng nồng độ dịch khuẩn OD_{600} = 0,8-1,0 khi tiến hành lây nhiễm với nốt lá mầm Đậu tương và thu được tần số biểu hiện tạm thời của gen GUS lên đến 83,3%. Các kết quả nghiên cứu khác cũng cho kết quả tương tự TTC.Hoa, 2008; Miller và nnc, 2002; Par và nnc, 2004. Do vậy, từ kết quả nghiên cứu trên có thể sử dụng giá trị OD_{600} dao động từ 0,7-0,9 khi biến nạp vi khuẩn với giống Đậu tương William 82, tác giả đã dùng mật độ OD_{600} = 0,8 để biến nạp gen *GmMYB12A* với hiệu quả biến nạp gen đã được kiểm tra tồn tại của gen ở thế hệ T_2 là 9,78%.

3.2. Ảnh hưởng của thời gian biến nạp đến hiệu suất chuyển gen GUS vào giống Đậu tương Williams 82

Thời gian nhiễm khuẩn không chỉ quyết định tới khả năng xâm nhiễm của vi khuẩn vào mẫu biến nạp mà còn ảnh hưởng trực tiếp tới khả năng sống sót của mẫu trên môi trường chọn lọc. Chúng tôi bố trí thí nghiệm theo 5 công thức với các khoảng thời gian 5, 10, 15, 20 và 30 phút. Khi bị thương tổn, mẫu lây nhiễm tiết ra các phenol giúp cho vi khuẩn nhận biết và xâm nhiễm. Kết quả thu được cho thấy, khi lây nhiễm mẫu với dịch khuẩn ở thời gian 15 phút sẽ tạo điều kiện thuận lợi cho vi khuẩn xâm nhập vào vật chủ được dễ dàng hơn. Các tác giả TTC. Hòa. 2007, 2008; ĐT.Phong & NT.Thư, 2007 đã có những nghiên cứu về nhân tố thời gian.

Bảng 2. ***Ảnh hưởng thời gian biến nạp gen bằng phương pháp hút chân không***

Thời gian biến nạp	Tổng số mẫu nghiên cứu	Tỷ lệ mẫu sống (%)	Số mẫu biểu hiện gen GUS	Hiệu quả biểu hiện gen (%)	Hiệu quả biến nạp gen đã kiểm tra sau thế hệ T_2 (%)
5	105	92,38	79	75,24	
10	105	90,48	82	78,09	
15	105	89,52	87	82,86	9,78
20	105	87,62	85	80,95	
30	105	84,76	80	76,19	

Phân tích số liệu, kết quả thu được trình bày như bảng 2. Kết quả nghiên cứu cho thấy, thời gian biến nạp 5 phút và 10 phút có tỉ lệ mẫu sống cao tương ứng là 92,38% và 90,48%; hiệu quả biểu hiện gen tăng tương ứng là 75,24%; 78,09%, đối với mẫu ở thời gian nhiễm khuẩn 15 phút cho tỷ lệ biểu hiện tạm thời gen GUS-plus cao nhất (82,86%) trong các công thức thí nghiệm. Đối với mẫu nhiễm khuẩn với thời gian 20, 30 phút cho tỷ lệ biểu hiện tạm thời gen GUS-plus là 80,95% và 76,19% tương ứng. Tuy nhiên từ thực nghiệm nhận thấy ở thời gian nhiễm khuẩn càng lâu thì tỷ lệ mẫu bị úng nhũn và nhiễm lại cao, khó diệt khuẩn.

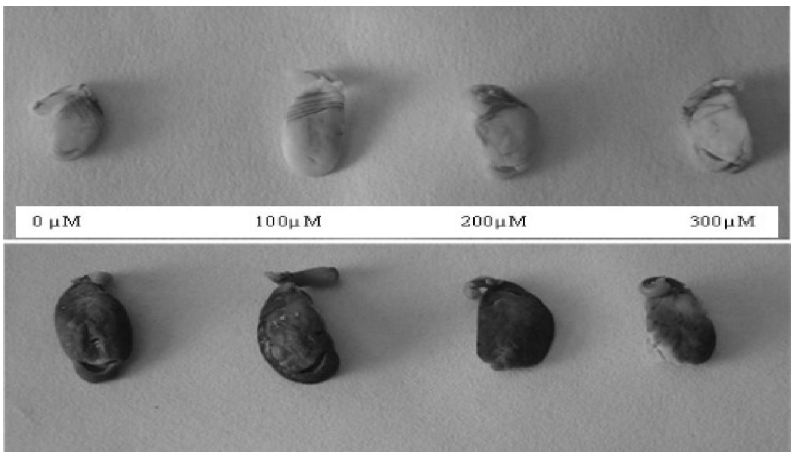
Quan sát mẫu thấy rằng ở thời gian biến nạp là 15 phút thì mẫu khỏe, đảm bảo được khả năng sống sót sau chuyển gen và đến bước tiếp theo để tạo cây chuyển gen. Còn ở thời gian biến nạp là 5 và 10 phút thì quan sát thấy mẫu cũng khỏe, nhưng tần số chuyển gen ở 2 thời gian này thấp hơn với thời gian 15 phút nhiều, còn ở 20; 30 phút thì mẫu có sức sống giảm xuống với tỷ lệ 87,62%; 84,76% và tần số biến nạp thấp dần. Vì vậy, thời gian biến nạp thích hợp nhất với gen *MYB12A* vào giống Đậu tương Williams là 15 phút. Hiệu quả biến nạp thu được 9,78% mẫu dương tính khi phân tích CTAB và Western blot ở các thế T_0, T_1, T_2 (Hình 5).

3.3. Ảnh hưởng của hàm lượng Acetosyringone (AS) lên tỉ lệ biểu hiện tạm thời của gen *MYB12A* gắn gen GUS

Nửa hạt đậu sau khi tách, gây tổn thương được lây nhiễm và nuôi cấy cộng sinh trên môi trường CCM có bổ sung Acetosyringone ở các nồng độ 0, 100, 200 và 300 µM. Chủng vi khuẩn được sử dụng với OD_{600} = 0,8 để lây nhiễm. Kết quả thí nghiệm được trình bày ở bảng 3.

Bảng 3. ***Ảnh hưởng của hàm lượng AS (Acetosyringone) tới sự biểu hiện tạm thời của gen GUS***

Nồng độ AS (µM)	Tổng số mẫu nghiên cứu	Số mẫu sống (%)	Số mẫu biểu hiện gen GUS	Hiệu quả biểu hiện gen (%)	Hiệu quả biến nạp gen đã kiểm tra sau thế hệ T_2 (%)
0	95	91,58	9	9,47	
100	95	89,47	58	61,05	
200	95	85,26	77	81,05	9,78
300	95	84,21	67	70,53	



Hình 3. ***Kết quả biểu hiện gen GmMYB12A có gắn gen GUS ở các nồng độ AS khác nhau***

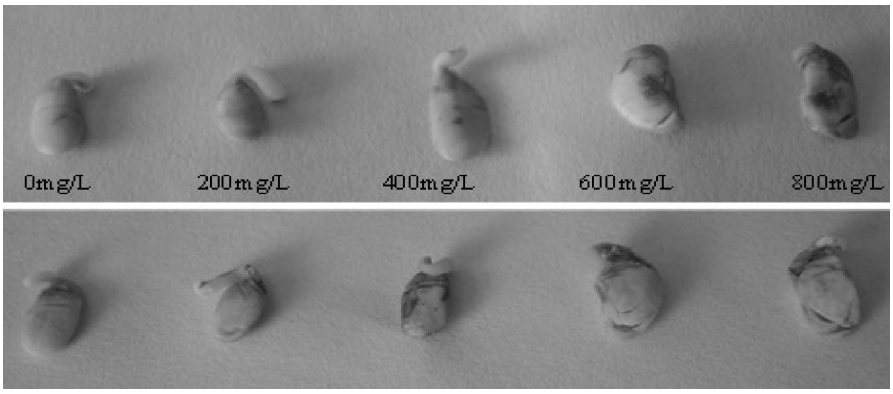
Kết quả thí nghiệm trình bày ở bảng 3 và hình 3 cho thấy AS có ảnh hưởng rõ rệt tới tỷ lệ biểu hiện tạm thời của gen GUS ở giống Đậu tương Williams 82, mẫu nửa hạt Đậu tương sau khi lây nhiễm và đồng nuôi cấy trong môi trường không có AS (0 µM) hiệu quả biến nạp gen rất thấp 9,47%. Khi bổ sung chất dẫn dụ AS vào môi trường đã có tác động rõ rệt đến khả năng xâm nhiễm của vi khuẩn *Agrobacterium* vào mô thực vật, tần số biểu hiện gen tạm thời dao động từ 61,05% đến 81,05%. Tỉ lệ biểu hiện tạm thời đạt cao nhất ở nồng độ 200 µM là 81,05% khi bổ sung vào môi trường đồng nuôi cấy CCM. Khi bổ sung nồng độ AS cao 300 µM lại làm giảm tỉ lệ biểu hiện tạm thời của gen GUS là 70,53%. Trong khi đó tỉ lệ mẫu sống giảm đi không đáng kể với tỉ lệ tương ứng là 91,58%; 89,47%; 85,26% và 84,21%, điều này nói lên rằng AS ở nồng độ từ 0 đến 200 µM ít làm mẫu thí nghiệm bị chết. Như vậy, khi tăng hoặc giảm nồng độ AS ở ngưỡng 300 µM cho thấy hiệu quả biến nạp gen có biểu hiện giảm (bảng 3). Điều này có thể giải thích là ở nồng độ thích hợp, AS với vai trò cảm ứng sẽ giúp cho các vùng gen *Vir* trên Ti-plasmid hoạt động và tăng cường biểu hiện. Khi nồng độ AS trong môi trường thấp sẽ không kích thích được các gen vùng *Vir* quá trình chuyển T-DNA. Ngược lại, nếu quá cao sẽ ức chế sự hoạt động của vùng gen này làm cho cơ chế chuyển vùng T-DNA vào tế bào thực vật kém hiệu quả, kết quả này cũng phù hợp với các nghiên cứu của Margie và nnc, 2004; Paz và nnc, 2004; Perl và nnc, 1996.

Nhận xét này cũng tương tự với kết quả nghiên cứu của TTC.Hòa và nnc, 2007. Thí nghiệm đã thu được tần số biểu hiện tạm thời cao nhất ở môi trường lây nhiễm và đồng nuôi cấy có bổ sung 200 µM AS (đạt 86,67%). Kết quả này được sử dụng trong các thí nghiệm tiếp theo.

3.4. Ảnh hưởng của nồng độ L-Cys tới hiệu quả chuyển gen

Bảng 4. ***Ảnh hưởng của nồng độ L-Cys tới hiệu quả chuyển gen***

Nồng độ L-Cys (mg/L)	Tổng số mẫu nghiên cứu	Tỉ lệ mẫu sống (%)	Số mẫu biểu hiện gen GUS	Hiệu quả biểu hiện gen (%)	Hiệu quả biến nạp gen đã kiểm tra sau thế hệ T_2 (%)
0	105	85,71	15	14,29	
200	105	82,86	73	69,52	
400	105	81,90	83	79,05	9,78
600	105	79,05	69	65,71	
800	105	78.10	53	50,48	



Hình 4. ***Kết quả biểu hiện gen GmMYB12A có gắn gen GUS ở các nồng độ L-Cystein khác nhau***

Để xác định ảnh hưởng của L-Cystein đến hiệu quả chuyển T-DNA vào nửa hạt Đậu tương. Nửa hạt đậu được gây tổn thương 6-7 vết khứa nhỏ và lây nhiễm với chủng vi khuẩn mang gen *GmMYB12A* sau đó đồng nuôi cấy 5 ngày trên môi trường CCM bổ sung L-Cys ở các nồng độ 0, 200, 400, 600 và 800 mg/L. Theo dõi và đánh giá kết quả biểu hiện gen ở bảng và hình 4. Kết quả chỉ ra rằng: khi bổ sung L-Cystein từ 200 - 800 mg/L vào môi trường CCM, hiệu quả biểu hiện gen biến nạp tăng từ 69,52% đến 79,05%, trong khi đó nồng độ L-Cys ảnh hưởng không lớn tới tỉ lệ sống của mẫu nuôi cấy (85,71% giảm 78,10%). Hiệu quả biến nạp gen cao nhất (79,05%) khi bổ sung 400 mg/L L-Cystein. Bổ sung L-Cystein ở nồng độ cao hơn hoặc thấp hơn 400 mg/L đều làm giảm hiệu quả biến nạp gen *GmMYB12A*. Kết quả này cũng tương ứng với một số công trình công bố gần đây của các tác giả Olhoft và D.A.Somers. 2001, tác giả đã làm tăng khả năng lây nhiễm của vi khuẩn *Agrobacterium* từ 37% lên 91% khi bổ sung 600 mg/L L-Cystein vào 1 lít môi trường đồng nuôi cấy; tác giả Perl và nnc. 1996 đã nghiên cứu nồng độ L - Cystein tương ứng và kết hợp với Dithiothreitol hay polyvinyl-polypyrrolidone. Khi theo dõi thí nghiệm, hiện tượng thâm nâu và hoại tử tại những vết gây tổn thương trên nửa hạt Đậu tương không xuất hiện. Điều này chứng tỏ có thể L-Cystein đã tương tác với vết thương của tế bào thực vật, vi khuẩn làm tăng sức sống của mẫu thí nghiệm. Vì vậy, làm tăng khả năng chuyển T-DNA vào các tế bào nốt lá mầm của Đậu tương dẫn tới hiệu quả chuyển gen *GmMYB12A* tốt hơn. Hiệu quả chuyển gen sau khi đã kiểm tra tồn tại ở thế hệ T_2 là 9,78% (Hình 5, 6)

Hình 5. ***Kết quả kiểm tra tồn tại của gen MYB12A sau khi chuyển ở các thế hệ T_0; T_1; T_2***

(A) Phân tích biểu hiện gen bằng phương pháp PCR ở thế hệ T_0, trong đó M: Marker 2000 bp, 1: mẫu dương tính (plasmid), 2: mẫu âm tính (cây không chuyển gen), từ 3 đến 8 là mẫu cây chuyển gen ; (B) Kiểm tra gen nhanh bằng phương pháp QuickStix ở thế hệ T_1; (C) Phân tích sự tồn tại gen bền vững bằng phương pháp Western blot ở thế hệ T_2

Hình 6. ***Ảnh cây Đậu tương tác giả đã chuyển gen*** **MYB12A**

IV. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, phân tích mức độ biểu hiện gen *GmMYB12A* có gắn gen GUS ở dòng Williams 82 cho thấy hiệu quả biến nạp gen tạm thời khá cao, đã chỉ ra ngưỡng nồng độ vi khuẩn OD_{600} = 0,7 - 0,9 biến nạp gen *GmMYB12A* là tốt nhất; thời gian biến nạp gen bằng phương pháp hút chân không phù hợp là 15 phút, tại nồng độ 200 µM AS có tỉ lệ biểu hiện gen cao 81,05%, ở nồng độ 400 mg/L L-Cys có tỉ lệ biểu hiện gen *MYB12A* cao nhất (79,05%). Sau khi dùng kỹ thuật sinh học phân tử để phân tích, kiểm tra sự có mặt của gen *MYB12A* bằng phương pháp CTAB ở thế hệ T_0; QuickStix ở thế hệ T_1 và Southern blot, Western blot ở thế hệ T_2, hiệu quả biến nạp gen đạt được là 9,78%. Nó đã làm tăng hàm lượng isoflavone trong hạt Đậu tương Williams 82 khi dùng phương pháp high-performance liquid chromatographic (HPLC) phân tích xác định, có thể tăng tới 0,7 µg/mg so với Đậu tương không chuyển gen.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Thị Cúc Hoà (2008). *Hiệu quả tạo đòn Đậu tương biến đổi gen từ giống MT176, HL 202, Maverick và Williams 82 bằng phương pháp nốt lá mầm qua trung gian Agrobacterium tumefaciens.* Tạp chí Nông Nghiệp và Phát triển nông thôn, (1), trang 14- 19.

2. Margie M. Paz , Juan Carlos Martinez , Andrea B. Kalvig , Tina M. Fonger , Kan Wang (2006). *Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient Agrobacterium-mediated soybean transformation.* Plant Cell Rep 25: 206–213.

3. Meurer, C.A., Dinkins, R.D., Collins, G.B., (1998). *Factors affecting soybean cotyledonary node transformation*. Plant Cell Rep18(3-4):180-186.

4. Nguyễn Văn Phong, Phùng Văn Phê, Vũ Thị Hụê, Hà Văn Huân, Bùi Văn Thắng, Nguyễn Quỳnh Trang, Nguyễn Thanh Thuỷ Vân (2009). *Nhân giống Vù hương để tạo nguồn giống phục vụ chương trình làm giàu rừng.* Tạp chí Kinh tế Sinh thái, 27, 46-50.

5. Olhoft.P.M, Somers D.A (2001). *L-Cystein increases Agrobacterium-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells.* Plant Cell Rep 20: 706-711.

6. Xiaowei Li, Jingwen Li, Ying Zhai, Yan Zhao, Xu Zhao, Haijun Zhang, Liantai Su, Ying Wang, Qingyu Wang (2013). *A R2R3-MYB transcription factor, affects the expression level of flavonoid biosynthesis genes encoding key enzymes ing transgenic Arabidopsis plants.* Gene 532: 72-79.

FACTORS RESPONSIBLE FOR THE EFFICIENCY OF SOYBEAN BY USING *GMMYB12A* GENE

Nguyen Van Phong, HongDi. Chen, ChangYuan. Ji, Wei. Teng, Waqas Ahmad, JingWen. Li, Ying. Wang, XiaoWei. Li, Pham Van Dien, QingYu. Wang

SUMMARY

Biotechnology is the use of living systems and organism to develop or make useful products. Gen technology opens a new stage in the field of plant varieties. It allows us to identify the genes, and to create new breeds which bring new features oriented, plants with shortened breeding time. It helps in improving the desired properties of the genes leading to proper transformation into an organism. *MYB12A* gene is the gene that related to high levels of isoflavones. Soy isoflavones are a class of secondary metabolites, which affects cell division, new cell formation. It is capacle of preventing the disease: osteoporosis, hypertension, cardiovascular disease, increased cholesterol witness blood cancer and some symptoms of menopause women... In this study, authors revealed, the threshold concentration of *Agrobacterium tumefaciens* OD_{600} = {0.7 - 0.8} was found with the suitable transformation time of 15 minutes. A higher rate in gene expression was found at 200 µM AS (81.05%) while the highest (79.05%) was come to be at 400 mg/L L-Cys. The molecular characterization using polymerase chain reaction and Western blot analysis confirmed insertion and inheritance of the transgenic and their progeny. CTAB method reveled the presence of *GmMYB12A* gene with the values of T_0; QuickStix in T_1 and Western blot in T_2, the transgenic efficacy was 9,78%.

Keywords: ***MYB12A, half-seed explants, soybean transformation, plant regeneration, Williams 82.***

Người phản biện: TS. Chu Hoàng Hà

Ngày nhận bài : 24/01/2014
Ngày phản biện : 13/03/2014
Ngày quyết định đăng : 10/06/2014