TIỂU BAN
CÔNG NGHỆ SINH HỌC

MỘT SỐ KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU CHUYỂN GEN VÀO CÂY TRỒNG

Nguyễn Hữu Hổ, Lê Tấn Đức, Nguyễn Thị Thanh, Nguyễn Hữu Tâm, Võ Phan Mi Sa, Phan Tường Lộc, Phạm Đức Trí, Mai Trường

Viện Sinh học Nhiệt đới - Viện KH&CNVN
1 - Mạc Đĩnh Chi, Q. 1, Thành phố Hồ Chí Minh
ĐT: 38978796; Fax: 38241346; E-mail: geneng@hcm.vnn.vn

TÓM TẮT:

Nội dung bài báo trình bày một số kết quả nghiên cứu hiện nay tại Viện Sinh học Nhiệt đới về sử dụng vi khuẩn Agrobacterium tumefaciens để chuyển một số gen có ích vào một số cây trồng kinh tế. Mục đích các nghiên cứu này nhằm tạo các dòng cây trồng có được các tính trạng quý qua sự thâm nhập và biểu hiện của gen chuyển - hướng tới khả năng đưa các dòng cây này vào thực tiễn sản xuất nông nghiệp. Về mặt khoa học, các dòng cây chuyển gen đã được kiểm tra bằng một số phương pháp sinh học và sinh học phân tử.

Từ khoá: ***Chuyển gen, vi khuẩn Agrobacterium tumefaciens, plasmid, môi trường chọn lọc, PCR.***

1. MỞ ĐẦU

Hiện nay, ngoài phương pháp tạo giống cây trồng truyền thống như lai hữu tính, gây đột biến…, phương pháp chuyển nạp gen đã và đang chứng tỏ là công cụ hỗ trợ rất đắc lực cho công tác tạo giống với ưu điểm nổi trội là rút ngắn được thời gian tạo giống và có thể được áp dụng trong điều kiện quỹ gen cây trồng trong tự nhiên còn hạn chế. Đến nay đã có khá nhiều giống cây trồng chuyển nạp gen được trồng trên diện rộng ở nhiều nước nhằm mục đích thương mại. Qua sử dụng các gen vừa có ý nghĩa khoa học và ứng dụng như gen phát sáng *gfp*, gen *ipt* liên quan đến sinh tổng hợp cytokinin – làm chậm sự lão hóa kết hợp với kỹ thuật chuyển nạp gen nhờ vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*, Phòng Công nghệ gen Viện Sinh học Nhiệt đới đã và đang triển khai tích cực một số nghiên cứu nhằm tạo ra một số dòng cây trồng kinh tế chuyển gen (phong lan, cúc) có tiềm năng ứng dụng vào sản xuất nông nghiệp.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Chuyển gen vào cây phong lan Dendrobium sp.:

Giống lan: Sử dụng giống lan Dendrobium Burana White có hoa màu trắng (cung cấp bởi CN. Vũ Ngọc Phượng, Phòng Công nghệ tế bào thực vật Viện Sinh học Nhiệt đới).

Môi trường và điều kiện nuôi cấy mô: 1/ Môi trường nuôi, nhân protocorm - like body (PLB): 1/2 MS (Murashige - Skoog, 1962) có 1 mg/l BA. **2/** Môi trường tạo sự vươn chồi (từ PLB) và nuôi cây: 1/2 MS có 10% nước dừa (v/v). Điều kiện nuôi cấy: 9 giờ chiếu sáng / ngày, nhiệt độ 25 - 28^{o}C.

Dòng vi khuẩn, môi trường, điều kiện nuôi cấy; tách chiết DNA plasmid: Sử dụng dòng vi khuẩn Agrobacterium tumefaciens LBA 4404 chứa plasmid pITB-T7GFP (kích thước ≈13,58 kb, do TS. Nguyễn Hữu Tâm thiết kế) mang gen gfp (promoter T7) và gen

kháng hygromycin hph (promoter CaMV35S). Môi trường giữ giống vi khuẩn là môi trường LB có 100 mg/l kanamycin. Để nhân giống cho nghiên cứu chuyển gen, vi khuẩn được nuôi cấy lắc qua đêm trong môi trường khoáng AB (Chilton và cs., 1974) cũng có nồng độ kanamycin như trên. Nhiệt độ nuôi cấy: 25 - 28^{o}C. Phương pháp tách chiết, tinh sạch DNA plasmid được thực hiện theo hướng dẫn ở bộ kit của công ty QIAGEN (QIAquick Gel Extraction Kit, 2006).

Thử tính chống chịu tự nhiên của mô PLB, cây con đối với kháng sinh hygromycin: Nuôi cấy PLB (kích thước khoảng 3 x 3 mm), cây con (cao khoảng 1,5 cm) trên môi trường số 1 và 2, theo thứ tự, có bổ sung hygromycin 20, 30, 40 và 50 mg/l. Theo dõi, ghi nhận ảnh hưởng của hygromycin sau 1,5 - 2 tháng nuôi cấy.

Quy trình chuyển gen: Các cụm nhỏ PLB với kích thước 3 x 3 mm được sử dụng làm vật liệu chuyển gen. Các bước quy trình: **1/** Nuôi PLB trên môi trường số 1 trong 2 - 3 ngày. **2/** Gây nhiễm PLB với vi khuẩn trong 30 phút; vớt mẫu ra, thấm bớt dịch vi khuẩn thừa bằng giấy lọc. **3/** Nuôi chung PLB với vi khuẩn trong 7 ngày trên môi trường số 1 có acetosyringone (AS) 100 μM. **4/** Rửa sạch vi khuẩn bằng nước cất và dung dịch cefotaxime 500 mg/l (kết hợp lắc nhẹ). **5/** Vớt mẫu ra, thấm ráo nước và cấy PLB trên môi trường chọn lọc: môi trường số 1 có 20 mg/l hygromycin, 500 mg/l cefotaxime; thực hiện 2 chu kỳ chọn lọc, thời gian 20 ngày / chu kỳ. **6/** Tiếp tục chọn lọc thêm 3 chu kỳ (20 ngày / chu kỳ) trên môi trường như trên nhưng có 30 mg/l hygromycin. **7/** Cấy truyền PLB kháng hygromycin sang môi trường số 2 cũng chứa 30 mg/l hygromycin đến khi vươn chồi; thời gian nuôi khoảng 2 - 3 tháng.

Kiểm tra PLB, chồi chuyển gen: 1/ Tách các chồi vươn cao (khoảng 1-1,5 cm) và cấy truyền sang môi trường số 2 có 30 mg/l hygromycin và theo dõi khả năng sinh trưởng (vươn cao, ra rễ) sau 1,5 - 2 tháng nuôi. **2/** Tách DNA từ PLB/cây: theo Dellaporta và cs. (1983). **3/** PCR [Mồi gen gfp: GFP1: 5’ – TGGAGAGGGTGAAGGTGATG - 3’, GFP2: 5’ –TGTGTGGACAGGTAATGGTTG - 3’; chương trình nhiệt: 94^{0}C: 5 phút; 30 chu kỳ (94^{0}C: 1 phút, 55^{0}C: 1 phút, 72^{0}C: 1 phút); 72^{0}C: 10 phút; khuếch đại đoạn DNA 500 bp; mồi gen hph: HPH1: 5’ - CGTCGTTCGAGAAGTTTC-3’, HPH2: 5’ – TACTTCTACACAGCCATC - 3’; chương trình nhiệt: 94^{0}C: 5 phút; 35 chu kỳ (94^{0}C: 1 phút, 62^{0}C: 1 phút, 72^{0}C: 1 phút); 72^{0}C: 5 phút; khuếch đại đoạn DNA 800 bp]. **4/** Sự phát sáng của PLB chuyển gen (quan sát trong điều kiện tối) bằng cách chiếu tia cực tím sóng dài (365 nm) từ đèn cực tím Blak-Ray (công ty UVP, San Gabriel, CA - Mỹ) hoặc sử dụng kính hiển vi soi nổi huỳnh quang Nikon; chụp ảnh qua kính hiển vi soi nổi bằng máy ảnh kỹ thuật số Nikon 8700 8 Mpixels (khi dùng đèn cực tím) hoặc dùng camera (khi dùng hệ thống kính hiển vi soi nổi huỳnh quang). **5/** Sự hiện diện của protein GFP đ-ược kiểm tra bằng thiết bị phân tích tự động Agilent 2100 Bioanalyzer của công ty Agilent Technologies với bộ kit Protein 50 LabChip của công ty Caliper Life Science (Mỹ).

2.2. Chuyển gen vào cây cúc Dendranthema grandiflorum:

Giống cúc: Sử dụng giống cúc đại đoá vàng Dendranthema grandiflorum (tỉnh Đồng Tháp).

Thử tính chống chịu đối với hygromycin và điều kiện nuôi cấy: Môi trường dùng thử tính chống chịu: MS không chất điều hoà sinh trưởng (ĐHST) (đối với cây con cao khoảng 2 cm) và môi trường có 0,5 mg/l NAA + 1 mg/l BA (đối với mảnh lá 1 x 1 cm) có hygromycin 5 – 10 mg/l; theo dõi sau 1,5 tháng nuôi. Điều kiện nuôi cấy: như trường hợp cây phong lan.

Dòng vi khuẩn, môi trường, điều kiện nuôi cấy; tách DNA plasmid: Sử dụng dòng vi khuẩn Agrobacterium tumefaciens LBA 4404 chứa plasmid pVDH396 (kích thước ≈ 15,9 kb) (do TS. Nguyễn Thị Thanh thiết kế) mang gen ipt tạo enzyme isopentenyl transferase [promoter SAG12 (senescence associated gene 12, từ Arabidopsis thaliana), gen gusA (có intron, promoter CaMV35S) và gen hph (promoter CaMV35S). Môi trường giữ giống vi khuẩn: LB có 50 mg/l kanamycin. Vi khuẩn được nuôi cấy lắc qua đêm trong môi trường AB cũng có nồng độ kanamycin như trên; nhiệt độ nuôi cấy: 25 - 28^{o}C. Phương pháp tách chiết, tinh sạch DNA plasmid: như trường hợp cây phong lan.

Quy trình chuyển gen

Các mảnh lá kích thước 1 x 1 cm, từ cây in vitro trên môi trường MS không chất ĐHST, được sử dụng làm vật liệu chuyển gen. Các bước quy trình: **1/** Nuôi cấy mảnh lá trên môi trường MS có 0,5 mg/l NAA và 1 mg/l BA trong 2 ngày. **2/** Gây nhiễm mảnh lá với vi khuẩn trong 10 phút; vớt mẫu ra, thấm bớt dịch vi khuẩn thừa bằng giấy lọc. **3/** Nuôi chung mảnh lá với vi khuẩn trong 2 ngày; sử dụng môi trường như trên nhưng có AS 100 μM. **4/** Rửa sạch vi khuẩn bằng nước cất và dung dịch cefotaxime 500 mg/l (lắc nhẹ). **5/** Vớt mẫu ra, thấm ráo nước và cấy các mảnh lá trên môi trường chọn lọc: như môi trường ở bước 1 của quy trình nhưng có 10 mg/l hygromycin, 500 mg/l cefotaxime; thời gian nuôi 15 ngày / chu kỳ chọn lọc và thực hiện 2 chu kỳ. **6/** Tiếp tục thực hiện chọn lọc thêm 3 chu kỳ (15 ngày / chu kỳ) trên môi trường như trên nhưng có 6 mg/l hygromycin đến khi có chồi tái sinh. **7/** Cấy truyền các chồi / cụm chồi tái sinh (cao khoảng 0,5-1 cm) sang môi trường MS không chất ĐHST cũng chứa 6 mg/l hygromycin đến khi chồi vươn cao; thời gian nuôi khoảng 1-1,5 tháng.

Kiểm tra cây chuyển gen: 1/ Tách các chồi cao (khoảng 2 cm) và cấy truyền cũng sang môi trường MS không chất ĐHST có 6 mg/l hygromycin: theo dõi sự phát triển của chồi và ra rễ trong khoảng 1 tháng. **2/** Thử GUS (Jefferson và cs., 1987): ủ mô lá trong thuốc thử GUS qua đêm ở 37^{0}C (tủ ấm). **3/** Tách DNA từ lá: theo Dellaporta và cs., 1983. **4/** PCR [Mồi gen ipt: IPT1: 5’ – TCAACCGGAAGCGGACGACC – 3’, IPT2: 5’ – GCCATGTTGTTTGCTAGCCAG – 3’; chương trình nhiệt: 90^{0}C:10 phút; 40 chu kỳ (94^{0}C: 15 giây, 45^{0}C: 45 giây, 72^{0}C: 50 giây); 72^{0}C: 7 phút; khuếch đại đoạn DNA 355 bp; mồi gen hph: như trường hợp phong lan; mồi gen gusA: GUS1: 5’ – CCTGTAGAAACCCCAACCCGTG – 3’, GUS2: 5’ – CCCGGCAATAACATACGGCGTG – 3’; chương trình nhiệt: 94^{0}C: 3 phút; 30 chu kỳ (94^{0}C: 30 giây, 56^{0}C: 45 giây, 72^{0}C: 1 phút); 72^{0}C: 10 phút; khuếch đại đoạn DNA 365 bp].

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Chuyển gen vào cây phong lan:

Trong xu hướng thế giới hiện nay, gen gfp là gen được quan tâm nghiên cứu trên các đối tượng cây hoa nhằm tạo cây hoa chuyển gen mang đặc tính phát sáng xanh lá (green fluorescent flower) [11]. Đặc tính phát sáng sinh học (bioluminescent) cũng đã được nghiên cứu trên cây phong lan với gen luc có nguồn gốc từ động vật đom đóm [3]. Ở lĩnh vực nghiên cứu chuyển gen vào lục lạp, ngoài các đối tượng cây trồng được quan tâm là các cây thuộc họ Cà thì cây hoa cũng là đối tượng được quan tâm nghiên cứu chuyển gen gfp [9].

Tính chống chịu tự nhiên của mô PLB, cây con đối với hygromycin

Trên môi trường có thang nồng độ hygromycin từ 20 – 50 mg/l, nhận thấy ở nồng

độ thấp (20 mg/l), một số ít PLB, cây con còn sống sót tại thời điểm quan sát nhưng có biểu hiện rất xấu về đặc điểm hình thái cũng như khả năng sinh trưởng – xanh nhạt, nhiều nơi trên cụm chuyển màu nâu đen (đối với PLB); đối với cây thì đầu lá bị cháy, gốc cây hoá nâu, đầu rễ bị thui chột. Trên môi trường có 30 mg/l, toàn bộ PLB và cây con chết ở cuối giai đoạn nuôi cấy; ở nồng độ 50 mg/l, sự chết nâu đen xảy ra nhanh chỉ sau khoảng 1 tháng, đặc biệt đối với PLB; do vậy, nồng độ hygromycin 30 mg/l được áp dụng để chọn lọc và đánh giá các dòng chuyển gen giả định. Ghi nhận này phù hợp với một số tác giả nghiên cứu nước ngoài khi dùng hygromycin để chọn lọc tế bào chuyển gen cây trồng này. Việc áp dụng chế độ chọn lọc dùng nồng độ hygromycin từ thấp đến cao (tăng dần từ 20 mg/l đến 30 mg/l), theo chúng tôi, nhằm tạo điều kiện cho tế bào chuyển gen tăng sinh giai đoạn ban đầu.

Giai đoạn nuôi chung

Sau nuôi chung trên môi trường 1/2 MS có 1 mg/l BA và 100 μM acetosyringone, nhận thấy vi khuẩn phát triển thường rất kém, khó nhận biết được bằng mắt thường. Theo nhiều tài liệu, giai đoạn nuôi chung mang tính quyết định tần số chuyển gen. Vì vậy, thời gian nuôi chung được kéo dài lên 7 ngày. Thời gian nuôi chung kéo dài ở nghiên cứu của chúng tôi phù hợp với một số nghiên cứu trên thế giới về chuyển gen cây phong lan Dendrobium (có lô thí nghiệm kéo dài hàng tháng) [14]; theo chúng tôi có thể do mô PLB khá cứng, có bề mặt tương đối trơn láng tạo độ bám ít, có thể trong cây có hợp chất không thuận lợi cho sự phát triển của vi khuẩn; hơn nữa, nồng độ khoáng môi trường dùng nuôi chung lại thấp (1/2 MS). Bình thường, theo nhiều công bố về chuyển nạp gen vào cây trồng, giai đoạn nuôi chung mô với vi khuẩn chỉ kéo dài từ 2 - 3 ngày.

Quy trình chuyển gen

Sau thời gian chọn lọc trên môi trường có 20 mg/l hygromycin, nhận thấy có sự hình thành một số cụm mô mới. Tuy nhiên không phải tất cả các PLB sống trên môi trường có 20 mg/l hygromycin đều có khả năng sinh trưởng bình thường trên môi trường có 30 mg/l hygromycin. Các PLB hình thành và phát triển tốt ở chu kỳ 30 ng/l hygromycin đầu cũng thường tăng sinh tốt ở các chu kỳ sau. Theo chúng tôi, cần áp dụng chế độ chọn lọc theo cách tăng dần nồng độ hygromycin vì bản chất tế bào cấu thành PLB không phải là tế bào mô sẹo (đã biệt hoá) nên tính độc lập tương đối của chúng trong hệ thống không cao, chúng cần có điều kiện và thời gian để tăng sinh bên cạnh số lượng lớn các tế bào không được chuyển gen đang chết dần - có thể tạo ra các chất không thích hợp cho sự phát triển của tế bào chuyển gen. Nhận thấy các mô có khả năng tăng sinh mạnh trên môi trường 30 mg/l hygromycin (do được chuyển gen) vẫn có khả năng phát triển bình thường trên môi trường có nồng độ hygromycin cao (50 mg/l).

Kiểm tra khả năng ra rễ trên môi trường có hygromycin

Các chồi lớn (1,5 – 2 cm) nhận được trên môi trường chọn lọc đúng ngưỡng (30 mg/l) được cấy truyền sang môi trường số 2 có 30 mg/l hygromycin. Kết quả cho thấy các dòng cây chuyển gen ra rễ tốt, có sinh trưởng bình thường; ngược lại, cây đối chứng có biểu hiện mất khả năng sinh trưởng và chết sau 1,5 - 2 tháng nuôi cấy.

Phân tích PCR các gen gfp, hph

Sau giai đoạn kiểm tra khả năng sinh trưởng trên môi trường có 30 mg/l hygromycin, các dòng cây được kiểm tra về mặt sinh học phân tử qua phân tích PCR đối với các gen gfp, hph. Kết quả cho thấy có sự hiện diện của các băng DNA được khuếch đại tương ứng là 500 bp (hình 1) và 800 bp.

Phân tích protein

Sự hiện diện của protein GFP với trọng lượng phân tử ≈ 27 kDa (ở cây đối chứng không có) đã được ghi nhận với hàm lượng trung bình 1,3% (tính trên protein hoà tan tổng số).

Sự phát sáng của mô chuyển gen

PLB được để trong tối trong khoảng 2 tháng (nhằm ức chế sự hình thành diệp lục tố) được chiếu tia cực tím sóng dài 365 nm. Kết quả cho thấy có thể ghi nhận được sự phát sáng xanh lục bằng mắt thường. Các dòng cây chuyển gen đang được trồng ở vườn ươm và thử nghiệm phát sáng của hoa sẽ được triển khai thực hiện.

3.2. Chuyển gen vào cây cúc:

Thực tế nghiên cứu trên thế giới cho thấy ở một số trường hợp như cây hoa Dã yên Petunia, cây bông cải, cây cải xà lách kể cả cây cúc [7, 8] gen ipt tích hợp vào bộ gen cây chủ đã sản sinh cytokinin có ảnh hưởng tốt đối với tuổi thọ của lá và hoa của cây chuyển gen. Promoter SAG12 [10] tạo biểu hiện chuyên biệt khi mô bắt đầu đi vào trạng thái lão suy, là một trong các loại promoter được sử dụng nhiều hiện nay nhằm tránh tạo cytokinin dư thừa, cũng được chúng tôi sử dụng trong nghiên cứu này.

Khả năng chịu đựng tự nhiên của mô lá, cây con đối với hygromycin

Theo tài liệu công bố về chuyển gen dùng hygromycin thì cây cúc rất nhạy cảm đối với tác nhân này [1]. Qua thử nghiệm tính chịu đựng tự nhiên đối với hygromycin dùng mảnh lá và cây con, kết quả cho thấy các mảnh lá (kích thước 1 x 1 cm) và cây con (cao khoảng 2 cm) đều bị chết nâu trên môi trường có 10 mg/l hygromycin sau 1,5 tháng nuôi cấy. Trên môi trường có 5 mg/l hygromycin, ở mảnh lá có sự hình thành mô sẹo nhưng rất yếu và mô sẹo có màu nâu đen; đối với thử nghiệm trên cây con thì tuy cây cũng có sự tăng trưởng nhưng chậm; các lá gần gốc ở trạng thái héo nâu, rũ; rễ ngắn, có màu nâu đen, đầu rễ màu nâu đen. Trên giống cúc đại đoá Dendranthema grandiflora (Ramat.) Kitamura, dùng nồng độ 7 mg/l hygromycin để chọn lọc thì tuy nhận được mô chuyển gen nhưng không nhận được cây chuyển gen tái sinh [1]. Renou và cs. (1993) đã dùng 10 mg/l hygromycin để chọn lọc tế bào chuyển gen trên giống Dendranthema grandiflora Tzvelev. Ở nghiên cứu này, chúng tôi dùng nồng độ hygromycin 10 mg/l để chọn lọc ở giai đoạn đầu và sau đó dùng nồng độ 6 mg/l để chọn đến khi nhận được chồi tái sinh.

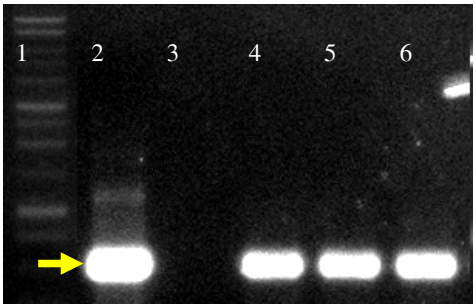
Quy trình chuyển gen

Do rất nhạy cảm với hygromycin nên sự chọn lọc được thực hiện ở giai đoạn đầu với 10 mg/l hygromycin (2 chu kỳ), sau đó giảm xuống còn 6 mg/l (3 chu kỳ) nhằm tạo điều kiện cho sự tái sinh chồi. Các chồi con và cây con được cấy truyền tiếp tục sang môi trường MS không chất ĐHST có 6 mg/l hygromycin đến khi nhận được cây lớn với bộ rễ phát triển. Trên môi trường có hygromycin, tế bào sống sót tăng sinh chậm và chồi tái sinh cũng phát triển khá chậm. Thực tế cho thấy khi đã là cây chuyển gen nhưng chúng vẫn có sinh trưởng không mạnh trên môi trường chỉ có 6 mg/l hygromycin. Theo chúng tôi, đây là điểm đáp ứng đặc thù của các giống cúc khi sử dụng tác nhân chọn lọc hygromycin. Qua nghiên cứu chuyển gen, chúng tôi đã nhận được khá nhiều dòng chồi tái sinh trên môi trường có 6 mg/l hygromycin.

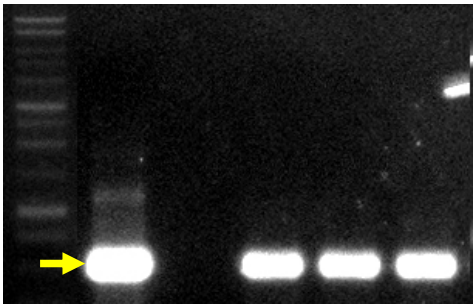
Kiểm tra khả năng sinh trưởng của chồi, cây con trên môi trường có hygromycin; thử GUS và phân tích PCR

Khá nhiều chồi nhỏ được cấy truyền sang môi trường MS không chất ĐHST có 6 mg/l hygromycin để tiếp tục theo dõi sự phát triển của chúng. Tuy trước đây chúng tái sinh trên môi trường có 6 mg/l hygromycin nhưng đến cuối giai đoạn kiểm tra này, chúng

tôi chỉ ghi nhận được 10 dòng chồi có khả năng vươn cao thành cây với bộ rễ phát triển, các chồi còn lại bị chết. Thử GUS các dòng cây có sinh trưởng bình thường trên môi trường có 6 mg/l hygromycin đều cho kết quả âm tính đối với thử nghiệm GUS (nhưng kết quả PCR dương tính). Điểm đặc biệt nữa là không chỉ riêng giống cúc này mà đối với giống cúc đại đoá vàng Đà Lạt (ở công bố khác) cũng xảy ra hiện tượng trên. Phân tích PCR gen ipt, hph, gusA cho thấy có sự hiện diện các băng DNA tương ứng là 355 bp (hình 2), 800 bp và 365 bp.



Hình 1. PCR gen *gfp* dương tính với băng DNA 500 bp (vị trí mũi tên). 1. Thang DNA chuẩn 1kb; 2. ĐC dương (plasmid); 3. ĐC âm (cây không chuyển gen); 4,5,6. Cây chuyển gen



Hình 2. PCR gen *ipt* dương tính với băng DNA 355 bp (vị trí mũi tên). 1. Thang DNA chuẩn 1 kb; 2. ĐC dương (plasmid); 3,4,5,6. Cây chuyển gen

4. KẾT LUẬN

Qua sử dụng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* để chuyển một số gen như gen phát sáng *gfp*, gen *ipt* làm chậm sự lão hóa vào hai loại cây trồng có giá trị kinh tế như phong lan, cúc, chúng tôi đã nhận được nhiều dòng cây trồng chuyển gen. Các dòng cây này đã được kiểm tra sự hiện diện và biểu hiện của gen chuyển bằng một số phương pháp sinh học định tính và sinh học phân tử. Chúng có thể được dùng như nguồn vật liệu phục vụ lai tạo giống cũng như có tiềm năng được ứng dụng trong thực tiễn sản xuất.

LỜI CÁM ƠN

Các tác giả xin chân thành cảm ơn Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam, Sở Khoa học và Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh đã tài trợ thiết thực cho nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Aswath C. R., Mo S. Y., Kim S. H., Kim D. H., 2004. *IbMADS4* regulates the vegetative shoot development in transgenic chrysanthemum [*Dendranthema grandiflora* (Ramat.) Kitamura]. *Plant Science* 166: 847-854.

[2] Chang H., Jones M. L., Banowetz G. M., Clark D. G., 2003. Overproduction of cytokinins in *Petunia* flowers transformed with P_{SAG12}-*IPT* delays corolla senescence and decreases sensitivity to ethylene. *Plant Physiology* 132: 2174-2183.

[3] Chia T. F., 2000. Bioluminescent orchid, Natural Science Academic Group, NTU, Singapore. E-mail: auctionadmin@interauct.com; *http://www.interauct.com*.

[4] Chilton M. D., Currier T. C., Farrand S. K., Bendich A. J., Gordon M. P., Nester E. W.,

1974. *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumours. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 71: 3672-3676.
[5] Dellaporta S. L., Wood J., Hicks J. B., 1983. A plant DNA minipreparation (version II). *Plant Mol. Biol. Rep*. 1(4): 19-21.
[6] Jefferson R. A., Kavanagh T. A., Bevan B. W., 1987. GUS fusion: β-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO* 6: 3901-3907.
[7] Khodakovskaya M. V., Li Y., Li J., Vankova R., Malbeck J., McAvoy R., 2005. Effects of *cor15a-IPT* gene expression on leaf senescence in transgenic *Petunia hybrida* and *Dendranthema grandiflorum*. Richard.McAvoy@uconn.edu.
[8] Khodakovskaya M. V., McAvoy R., Liu H., Li Y., 1998. Ethylene-regulated expression of the *ipt* gene increases flower number in transgenic *Dendranthema grandiflorum*. (Abstract), Society for *In Vitro* Biology.
[9] Maliga P., 1993. Towards plastid transformation in flowering plants. *Trends Biotech*. 11: 101-107.
[10] McCabe M. S., *et al*., 2001. Effects of P_{SAG12}-*ipt* gene expression on development and senescence in transgenic lettuce. *Plant Physiol*., 127: 505-516.
[11] Mercuri A., Sacchetti A., De Benedetti L., Schiva T., Alberti S., 2002. Green fluorescent flowers. *Plant Science* 162: 647-654.
[12] Murashige T., Skoog F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Physiol*. *Plant*.15: 473-497.
[13] Renou J. P., Brochard P., Jalouzot R., 1993. Recovery of transgenic chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum* Tzvelev) after hygromycin resistance selection. *Plant Science* 89: 185-197.
[14] Yu H., Yang S. H., Goh C. J., 2001. *Agrobacterium*-mediated transformation of a *Dendrobium* orchid with the class 1 *knox* gene *DOH1*. *Plant Cell Reports* 20: 301-305.

SOME RESULTS ON GENETIC TRANSFORMATION OF TWO ECONOMIC PLANT CULTIVARS

Nguyen Huu Ho, Le Tan Duc, Nguyen Thi Thanh, Nguyen Huu Tam, Vo Phan Mi Sa, Phan Tuong Loc, Pham Duc Tri, Mai Truong
Institute of Tropical Biology – Vietnamese Academy of Science and Technology
1 - Mac Dinh Chi Street, Ho Chi Minh City
Tel: 38978796; Fax: 38241346; E-mail: geneng@hcm.vnn.vn

SUMMARY

In the Institute of Tropical Biology, with the aim to generate the potential transgenic plant lines, some useful genes such as gfp, ipt were used for transformation via Agrobacterium tumefaciens. Many transgenic lines of Dendrobium Burana White orchid containing gfp gene, Dendranthema grandiflorum (Dong Thap province) with ipt gene were produced. They were confirmed by the qualitative and molecular analyses.

KHẢ NĂNG DIỆT KHUẨN CỦA LÒNG TRẮNG TRỨNG GÀ

Huỳnh Thị Bạch Yến
Khoa Khoa học Ứng dụng - Bộ Môn Công Nghệ Sinh Học
Trường Đại học Tôn Đức Thắng TP. HCM

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lysozyme trong lòng trắng trứng chứa 129 amino acid, là một muramidase và hydrolase-N-acetylmuramic. Là enzyme diệt khuẩn phổ biến nhất trong thiên nhiên và là enzyme hiện diện trong hầu hết các dịch tiết của cơ thể, mô người, động vật. Enzyme này cũng có trong thực vật, vi khuẩn và thể thực khuẩn. Lòng trắng trứng gà là nguồn lysozyme rất dễ sử dụng. Lysozyme xúc tác phản ứng thủy phân liên kết (1-4) glycosidic giữa acid N-acetymuraminic và N-acetylglucosamin. VK *Micrococcus luteus* rất nhạy cảm với lysozyme nên được dùng để khảo sát enzyme này. Ngoài ra trong lòng trắng trứng còn có các chất ovotransferrin, ovomucin… có khả năng diệt khuẩn hoặc kiềm khuẩn các vi khuẩn gram (+) và Gram (-) khác (Craig và Reg, 2002).

2. NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Đối tượng khảo sát:

Trứng gà Isa Brown
Số mẫu khảo sát: 215 mẫu trứng trên 2 đàn gà
Thời gian trữ trứng: 2 ngày, 7 ngày và 15 ngày ở nhiệt độ phòng thí nghiệm.

2.2 Nội dung khảo sát

Định hoạt lực diệt khuẩn *Micrococcus luteus* của lysozyme trong lòng trắng trứng (LAM: lysozyme activity on *Micrococcus luteus*)

Thực hiện theo kỹ thuật của Rasmusson 1999 cải tiến.

Nguyên lý: Lysozyme trong trứng có khả năng cắt liên kết β (1-4) glycosidic giữa các đơn vị đường amin hóa trên vách tế bào vi khuẩn (VK), làm vỡ tế bào và diệt khuẩn.

Định khả năng diệt khuẩn *Staphylococcus aureus* (BAS%: bactericide activity on *Staphylococcus aureus*) **và *Escherichia coli*** (BAE% bactericide activity on *Escherichia coli*)

Thực hiện theo kỹ thuật Mirnova và Kouzmina 1996 (dẫn liệu của Lê Khắc Thận, 2000).

Nguyên lý: Đánh giá khả năng diệt khuẩn trong dung dịch đệm khi có thêm hoặc không thêm lòng trắng trứng khảo sát, qua việc đo độ truyền suốt. Ống đối chứng không thêm lòng trắng trứng sẽ có nhiều vi khuẩn mọc, độ truyền suốt sẽ thấp hơn so với ống thí nghiệm có thêm lòng trắng trứng do có diệt khuẩn, hỗn hợp sẽ trong hơn, độ truyền suốt sẽ cao hơn.

2.3 Hóa chất

- Gốc vi khuẩn: *Micrococcus luteus, Staphylococcus aureus và Escherichia coli*
- Huyễn dịch vi khuẩn có khoảng 2.10^9 VK/ml nước muối sinh lý, có độ hấp thu quang học khoảng 80% (pha nồng độ VK theo McFarland, 1964; dẫn liệu của Đỗ Trung Phấn và Vũ Triệu An, 1982).
- Môi trường nuôi cấy vi khuẩn: thạch dinh dưỡng NA (nutrient Agar) vô trùng