

TẠO CÂY ĐẬU TƯƠNG CHUYỂN GEN CÓ KHẢ NĂNG SẢN XUẤT ASTAXANTHIN CHUYỂN BIỆT Ở HẠT THÔNG QUA VI KHUẨN *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

Hoàng Văn Dương^{1,2}, Phan Tường Lộc¹, Lê Tấn Đức¹,
Nguyễn Huỳnh Cẩm Tú¹, Trần Thị Ngọc Hà¹, Nguyễn Hữu Hồ¹

¹ Viện Sinh học Nhiệt đới, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

² Học viện Khoa học và Công nghệ, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam

TÓM TẮT

Đậu tương là cây trồng phổ biến và quan trọng hàng đầu trong nền nông nghiệp thế giới. Do đó, đây là loại cây nhận được nhiều quan tâm trong cải tạo giống, nâng cao năng suất, chất lượng. Hiện nay, đậu tương biến đổi gen là một trong những cây trồng công nghệ sinh học chính được trồng ở nhiều nước. Nghiên cứu chuyển gen tạo astaxanthin vào đậu tương sẽ giúp nâng cao giá trị hạt đậu, tạo sản phẩm có tiềm năng ứng dụng cao. Trong nghiên cứu này, nhiều phương pháp tạo vết thương mẫu khác nhau gồm dùng dao mổ, dao mổ kết hợp thấm hút chân không, sóng siêu âm đã được sử dụng để kiểm tra ảnh hưởng của mỗi phương pháp đến hiệu quả chuyển gen. Kết quả cho thấy việc kết hợp thấm hút chân không hoặc sóng siêu âm đã giúp tăng đáng kể hiệu quả chuyển gen vào đốt lá mầm. Nghiên cứu đã tạo được các dòng đậu tương chuyển gen sản xuất astaxanthin chuyển biệt ở hạt. Các dòng này đã được kiểm tra bằng PCR, Southern blot và tính kháng với thuốc diệt cỏ Basta. Hạt của các dòng đậu tương chuyển gen có sự phân ly màu, hạt chuyển gen màu đỏ, hạt không chuyển gen màu trắng. Hàm lượng astaxanthin trong hạt của hai dòng chuyển gen được xác định bằng phương pháp HPLC-MS cho kết quả lần lượt 0,31 và 0,77 µg/g. Các dòng đậu tương chuyển gen phát triển từ hạt có sự sinh trưởng, phát triển bình thường, không khác biệt đáng kể so với đối chứng. Các dòng chuyển gen T1 đều tạo được các hạt T2 chuyển gen màu đỏ. Như vậy, nghiên cứu đã tạo được các dòng đậu tương sản xuất astaxanthin chuyển biệt ở hạt có biểu hiện ổn định qua nhiều thế hệ.

Từ khóa: *Agrobacterium tumefaciens*, astaxanthin, chuyển gen, đậu tương, đốt lá mầm, một nửa hạt.

MỞ ĐẦU

Astaxanthin là một loại carotenoid có nhiều công dụng trong bảo vệ, tăng cường sức khỏe. Nhiều nghiên cứu cho thấy astaxanthin có tính chống oxy hóa mạnh, có tác dụng bảo vệ DNA, tăng cường hệ miễn dịch, giảm sự phát triển của khối u ung thư, hiệu quả trong hỗ trợ điều trị bệnh tiểu đường, stress oxy hóa, viêm, tim mạch, một số vấn đề về các chức năng thần kinh... (Goswami *et al.*, 2010; Fassett và Coombes, 2011). Ngoài ra, astaxanthin còn được sử dụng làm chất tạo màu tự nhiên phổ biến trong chăn nuôi, thủy sản. Hiện nay, nhu cầu astaxanthin rất lớn và ngày càng tăng, thị trường thế giới tiêu thụ khoảng 280 tấn, đạt giá trị 447 triệu USD năm 2014, ước tính đến năm 2020 đạt mức 1,1 tỉ USD. Do đó, giá astaxanthin trên thị trường rất cao, với astaxanthin tự nhiên là 2500-7000 USD/kg, astaxanthin tổng hợp khoảng 1000 USD/kg (Shah *et al.*, 2016; Molino *et al.*, 2018). Nghiên cứu chuyển gen tạo astaxanthin vào thực vật giúp tạo các sản phẩm chứa astaxanthin tự nhiên là một hướng nghiên cứu tiềm năng nhằm đa dạng hóa nguồn cung astaxanthin. Nhiều nghiên cứu chuyển gen tạo astaxanthin, có nguồn gốc từ vi khuẩn, tảo... vào các loại cây trồng khác nhau như cà chua, lúa gạo đã được thực hiện (Huang *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2018). Ở đậu tương, Pierce và đồng tác giả (2015) sử dụng các gen mã hóa enzyme β -carotene ketolase và phytoene synthase có nguồn gốc từ vi tảo *Haematococcus pluvialis* và vi khuẩn *Pantoea ananatis*, *Brevundimonas sp.* để chuyển gen đã tạo được dòng đậu tương có khả năng tổng hợp astaxanthin với hàm lượng đạt 2 - 7 µg/g. Astaxanthin được hình thành từ phân tử β -carotene, bằng cách thêm một nhóm hydroxyl (OH) và một nhóm cacbonyl (CO) tại nguyên tử cacbon số 3 và 4 ở mỗi vòng β . Đa số thực vật đều có enzyme có thể thêm nhóm hydroxyl vào vòng β carotenoid (Kim *et al.*, 2009), ngược lại việc thêm nhóm cacbonyl ở vị trí cacbon thứ 4 để tạo thành astaxanthin chỉ có ở một số loài thuộc chi *Adonis*. Chuyển hóa tạo astaxanthin từ β -carotene ở hoa *Adonis aestivalis* bắt đầu với phản ứng kích hoạt carbon số 4 của vòng β được xúc tác bởi enzyme carotenoid β -ring 4-dehydrogenase (CBFD). Sau đó, enzyme carotenoid 4-hydroxy- β -ring 4-dehydrogenase (HBFD) khử thêm H của carbon này để tạo thành một cacbonyl. Phản ứng cuối cùng bổ sung một nhóm hydroxyl ở carbon số 3 được xúc tác bởi enzyme CBFD. Như vậy, từ vòng β -carotene đã được chuyển thành vòng β -3-hydroxy-4-keto của astaxanthin (Cunningham và Gantt, 2011). Hai gen *cbfd* và *hbfd* đóng vai trò chủ yếu giúp chuyển hóa β -carotene thành astaxanthin ở cây hoa *Adonis aestivalis*, do đó được chọn để nghiên cứu biến nạp tạo cây đậu tương có khả năng tổng hợp astaxanthin.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Giống đậu tương, chủng vi khuẩn, plasmid

Giống đậu MTĐ 176, từ Bộ môn Di truyền - Giống nông nghiệp, Khoa Nông nghiệp & Sinh học Ứng dụng - Trường Đại học Cần Thơ.

Chủng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* EHA 105 dùng để biến nạp gen.

Plasmid pITB-AST (phòng Công nghệ Gen - Viện Sinh học Nhiệt đới) có kích thước khoảng 15,5 kb. T-DNA mang tổ hợp gen **Pglycinin-cbfd2-Tglycinin/Pglycinin-hbfd1-Tglycinin/Pglycinin-ZmPsy-Tglycinin** và gen chọn lọc **Pnos-bar-Tnos**. Như vậy, các gen *cbfd2*, *hbfd1* và *Zm-Psy* được điều khiển bởi promoter và terminator của gen mã hóa glycinin giúp các gen này có biểu hiện chuyên biệt ở hạt. Gen *Zm-psy* biểu hiện enzyme phytoene synthase tăng cường tổng hợp phytoene thúc đẩy gia tăng tổng hợp β -carotene trong hạt (Buckner *et al.*, 1996); gen *cbfd2* mã hóa enzyme carotenoid β -ring 4-dehydrogenase và gen *hbfd1* mã hoá enzyme carotenoid 4-hydroxy- β -ring 4-dehydrogenase của *Adonis aestivalis* giúp chuyển hóa β -carotene thành astaxanthin (Cunningham, Gantt, 2005; Cunningham, Gantt, 2011). Ngoài ra, gen *bar* quy định tính kháng phosphinothricin cũng được sử dụng như yếu tố chọn lọc mô và cây chuyển gen.

Môi trường và điều kiện nuôi cấy mô

Các môi trường trong nghiên cứu tham khảo theo Paz và đồng tác giả (2006), trong đó nồng độ BA trong môi trường SI thay bằng 2 mg/L. Các bước nuôi cấy mô được thực hiện trên đèn sáng với chu kỳ 18 sáng: 6 tối, cường độ sáng 2000 - 3000 lux, nhiệt độ 24°C.

Chuẩn bị vi khuẩn, chuyển nạp gen, chọn lọc và tái sinh cây chuyển gen

Vi khuẩn *A. tumefaciens* được nuôi cấy lác qua đêm trong 50 ml môi trường LB lỏng bổ sung kanamycin và rifamycin nồng độ 50 mg/L ở 28°C, 220 vòng/phút ($OD_{620nm} = 0.8 - 1.0$). Sau đó, ly tâm thu phần lắng vi khuẩn ở 4000 vòng/phút, 10 phút, 22°C. Hòa vi khuẩn trong 50 ml môi trường lây nhiễm, lác nhẹ khoảng 1 giờ trước khi sử dụng.

Mẫu đốt lá mầm được chuẩn bị theo phương pháp của Olhoft và đồng tác giả (2003), mẫu một nửa hạt theo phương pháp của Paz và đồng tác giả (2006). Mẫu đốt lá mầm được tạo vết thương bằng nhiều cách: dùng dao mổ 15 cắt nhẹ 5 lần theo phương vuông góc với hypocotyl; kết hợp dùng dao mổ với xử lý sóng siêu âm 30s; kết hợp dùng dao mổ với xử lý thấm chân không 60s (-20 in Hg). Mẫu sau khi tạo vết thương được ngâm vào dung dịch vi khuẩn đã pha loãng trong 30 phút, sau đó thấm bớt dịch vi khuẩn trên mô bằng giấy lọc vô trùng và cấy chuyển sang môi trường đồng nuôi cấy với mặt trong của lá mầm tiếp xúc với môi trường, ở nhiệt độ khoảng 24°C trong tối, thời gian 5 ngày. Trên bề mặt môi trường đặt một lớp giấy thấm để hạn chế sự phát triển của vi khuẩn.

Chọn lọc, tái sinh cây chuyển gen: Sau quá trình đồng nuôi cấy, mẫu được loại bỏ vi khuẩn bằng dung dịch rửa bổ sung 500 mg/L cefotaxime. Sau đó, chọn lọc chồi chuyển gen trong 4 tuần bằng cách cấy lên môi trường tái sinh chồi SI bổ sung cefotaxime 500 mg/L và PPT 6 mg/L. Chồi hình thành được phát triển chiều cao thân trên môi trường SE, giảm nồng độ chất chọn lọc PPT còn 4 mg/L. Khi chồi cao khoảng 3 cm, chuyển sang môi trường tạo rễ, hình thành cây hoàn chỉnh với 1 mg/L IBA. Mẫu được cấy chuyển sang môi trường mới sau mỗi 2 tuần.

Kiểm tra cây chuyển gen bằng PCR: DNA tổng số được tách từ các dòng đậu tương bằng bộ kit The DNeasy Plant Kit – QIAGEN. DNA này là nguyên liệu để thực hiện các kiểm tra cây chuyển gen bằng PCR và Southern blot. Kiểm tra sự hiện diện của gen *hbfd1*, *cbfd2*, *Zm-Psy*, *bar* trong cây đậu tương chuyển gen bằng kỹ thuật PCR với các cặp mồi đặc hiệu. Gen *hbfd1*, mồi 1: 5' - CTT TCC CAC ACC TTT TCC AA - 3' và mồi 2: 5' - GCA AGC AGA GAA GTG CAC AG - 3', khuếch đại đoạn DNA 400 bp, chương trình nhiệt: 94°C 4 phút, 35 chu kỳ (94°C/90 giây, 60°C/90 giây, 72°C/ 2 phút), 72°C 5 phút, bảo quản ở 4°C. Gen *bar*, mồi 1: 5' - ATG AGC CCA GAA CGA CG - 3' và mồi 2: 5' - TCA GAT CTC GGT GAC GG - 3', khuếch đại đoạn DNA 500 bp, chương trình nhiệt: 94°C 5 phút, 35 chu kỳ (94°C/60 giây, 62°C/60 giây, 72°C/1 phút 30 giây), 72°C 5 phút, bảo quản ở 4°C. Gen *cbfd2*, mồi 1: 5' -GAT AGC GAA CAC GTC GTT GA - 3', mồi 2: 5' - AGC CTC CTT GCC TTC TTT TC - 3', khuếch đại đoạn DNA 500 bp, chương trình nhiệt: 94°C/4 phút, 35 chu kỳ(94°C/90 giây, 60°C/90 giây, 72°C/ 2 phút), 72°C/5 phút. Gen *Zm-Psy*, mồi 1: 5'-TTG GAT GCT GCT CTT TCA GA-3', mồi 2: 5'-CCT CTT TCA GCT TCC TCG AA-3', khuếch đại đoạn DNA 446 bp, chương trình nhiệt: 94°C/5 phút, 35 chu kỳ (94°C/1 phút, 58°C/1 phút, 72°C/1 phút 30 giây),72°C/5 phút. Điện di sản phẩm PCR trên gel agarose 1% với thang chuẩn 1kb Promega. Xem kết quả, chụp hình gel bằng máy Gel Documentation - Biorad.

Kiểm tra cây chuyển gen bằng Southern blot: Dùng phương pháp tạo mẫu dò và phát hiện bằng CDP-*Star* của Amersham (GE Healthcare - RPN3680, RPN 3682) để phân tích các dòng cây đậu tương chuyển gen. DNA của mỗi dòng cây chuyển nạp gen và đối chứng âm (cây không được chuyển nạp gen) ủ với enzyme giới hạn *HindIII* ở 37°C trong 4 giờ. Đối chứng dương là plasmid pITB-AST được cắt với enzyme *HindIII* ở 37°C. Mẫu DNA được điện di trên gel agarose 1% ở 25 vol qua đêm cùng với thang chuẩn λ *HindIII*. Chuyển DNA lên màng lai Hybond-N (GE healthcare), lai qua đêm với mẫu dò là trình tự DNA 500bp đã được tinh sạch của gen *cbfd2* tạo ra từ phản ứng PCR. Mẫu dò cho thang chuẩn λ *HindIII* cũng được thực hiện cùng với mẫu dò cho gen *cbfd2*. Trong giai đoạn lai, bỏ đồng thời hai mẫu dò này vào buồng lai. Hiện phim theo hướng dẫn của Amersham.

Phân tích hàm lượng astaxanthin trong hạt: Astaxanthin trong hạt đậu tương được định tính và định lượng bằng phương pháp sắc ký lỏng ghép khối phổ (HPLC-MS) thực hiện tại Trung tâm Phân tích Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh.

Thử nghiệm ảnh hưởng của thuốc trừ cỏ Basta trên lá cây đậu tương ex vitro: Pha loãng thuốc trừ cỏ Basta (200 g/L glufosinate) để đạt nồng độ 100 mg/L, bổ sung thêm 50 μ L tween 20 trong 50 ml dung dịch. Dùng tăm bông thấm dung dịch rồi quét lên mặt trên cách phần ngọn lá khoảng 1,5 cm. Ghi nhận kết quả sau 7 ngày.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả chọn lọc, tái sinh, tạo cây kháng PPT

Mẫu đốt lá mầm và một nửa hạt sau khi xử lý chuyển gen với vi khuẩn được chọn lọc trên môi trường tái sinh chồi bổ sung 6 mg/L PPT. Sau giai đoạn này, đã nhận được các dòng đậu tương kháng với chất chọn lọc PPT với hiệu quả tạo dòng kháng khác nhau phụ thuộc vào cách thức tạo vết thương và loại mẫu: ở phương pháp dùng dao mổ tạo vết thương trên đốt lá mầm, ghi nhận tần số tạo dòng kháng là 1/150 (0,67%), kí hiệu dòng là D1; phương pháp tạo vết thương kết hợp sóng siêu âm 30s là 3/150 (2%), kí hiệu dòng là D2, D3, D4; phương pháp tạo vết thương kết hợp thấm chân không 60s là 3/150 (2%), kí hiệu dòng là D5, D6, D7. Ngoài ra phương pháp dùng mẫu một nửa hạt cũng ghi nhận kết quả tạo dòng kháng khá tốt với tần số là 2/200 (1%), kí hiệu dòng là D8, D9. Các dòng cây kháng PPT cao khoảng 3 cm được chuyển ra trồng ngoài vườn ươm. Như vậy, kết quả trên cho thấy sự kết hợp sóng siêu âm hoặc thấm chân không trong quá trình tạo vết thương mẫu đốt lá mầm đã giúp tăng đáng kể hiệu quả tạo dòng kháng chất chọn lọc. Sóng siêu âm, thấm chân không giúp tăng khả năng tiếp xúc của vi khuẩn với các tế bào thực vật, đặc biệt với các tế bào nằm bên dưới lớp biểu mô như mô phân sinh, qua đó giúp nâng cao hiệu quả chuyển gen. Điều này phù hợp với nghiên cứu của nhiều tác giả khác (Mariashibu *et al.*, 2012; Arun *et al.*, 2015). Ngoài ra, sử dụng mẫu một nửa hạt cũng đạt được tần số tạo dòng kháng khá cao, cho thấy đây là loại mẫu tiềm năng sử dụng để chuyển gen do việc chuẩn bị và xử lý mẫu tương đối nhanh, đơn giản.

Kiểm tra sự hiện diện của gen biến nạp trên các dòng kháng PPT bằng phương pháp PCR

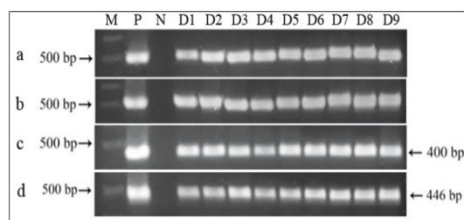
Các cây đậu tương kháng PPT được kiểm tra sự hiện diện của các gen biến nạp *bar*, *cbfd2*, *hbfd1*, *Zm-Psy* với các cặp mồi đặc hiệu. Kết quả cho thấy tất cả các cây kháng PPT đều có sự hiện diện của gen biến nạp với kích thước đoạn DNA khuếch đại đặc trưng bằng với đối chứng dương: gen *bar*, 500 bp (hình 1 a); gen *cbfd2*, 500 bp (hình 1 b); gen *hbfd1*, 400 bp (hình 1 c); gen *Zm-Psy*, 446 bp (hình 1 d). Do đó, có thể khẳng định đây là các cây đã được chuyển gen thành công. Tuy nhiên, khi cây được trồng trong điều kiện vườn ươm, trong số 9 cây chuyển gen, chỉ 5 cây D2, D3, D5, D8, D9 có khả năng thích nghi, phát triển, 4 cây không thể thích nghi và chết dần.

Kiểm tra cây chuyển gen bằng Southern blot

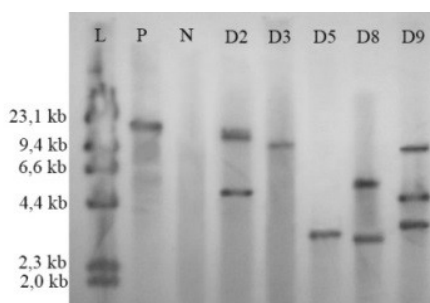
Phân tích Southern blot để kiểm tra sự hòa nhập bền vững của các gen biến nạp vào bộ gen của cây, đồng thời xác định dòng chuyển gen riêng biệt, dựa trên lai phân tử với mẫu dò là đoạn trình tự của gen *cbfd2* có kích thước 500 bp. Kết quả ghi nhận trên hình 2 cho thấy có sự hiện diện của băng lai ở các vị trí, kích thước khác nhau với các các dòng chuyển gen, trong khi đối chứng âm không hiện băng lai. Điều này chứng tỏ các dòng kiểm tra có sự gắn chèn của gen biến nạp trong bộ gen cây, đây là các dòng chuyển gen riêng biệt, với số bản sao ghi nhận được từ 1 đến 3. Như vậy, nhìn chung các cây chuyển gen nhận được có số lượng bản sao của gen chuyển trong bộ gen không quá nhiều, phù hợp với phương pháp chuyển gen thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* thường tạo ít bản sao. Tất cả các dòng này đều được tiếp tục phát triển, trồng trong vườn ươm để kiểm tra ảnh hưởng của việc gắn chèn các bản sao gen đến kiểu hình, sự sinh trưởng, phát triển cũng như khả năng sinh sản cây chuyển gen.

Kiểm tra tính kháng của cây chuyển gen với thuốc diệt cỏ Basta

Thí nghiệm sử dụng dung dịch Basta (100 mg/L glufosinate) quét lên mặt trên phiến lá để kiểm tra biểu hiện gen *bar* đồng thời hạn chế ảnh hưởng đến sinh trưởng, phát triển của cây nhằm tăng khả năng thu nhận hạt chuyển gen. Kết quả ghi nhận sau 7 ngày cho thấy lá của tất cả các dòng chuyển gen (D2, D3, D5, D8, D9) đều hầu như không bị ảnh hưởng, vẫn giữ màu xanh, trong khi đó lá của cây đối chứng bị mất màu xanh, cháy khô tại vùng quét Basta (hình 3). Điều này chứng tỏ gen kháng thuốc diệt cỏ *bar* trong cây chuyển gen đã biểu hiện giúp cây kháng được thuốc diệt cỏ ở nồng độ gây chết với cây đối chứng.



Hình 1. Kết quả điện di sản phẩm PCR gen *bar* (a), *cbfd2* (b), *hbfd1* (c), *Zm-Psy* (d) những dòng đậu tương kháng PPT. M: thang chuẩn 1kb (Promeaga); P: đối chứng dương *pITB-AST*; N: cây đối chứng không chuyển gen; D1, D2, D3, D4, D5, D6, D7, D8, D9: các cây chuyển gen giả định



Hình 2. Kết quả phân tích DNA cây đậu tương chuyển gen bằng Southern blot. M. Thang chuẩn λ *HindIII*; P. Đối chứng dương plasmid *pITB-AST*; N. Mẫu đậu tương không chuyển gen; D2, D3, D5, D8, D9. Các mẫu đậu tương dương tính PCR

Tóm lại, kết quả kiểm tra bằng PCR, Southern blot và tính kháng của cây với thuốc diệt cỏ Basta cho thấy các dòng cây nhận được qua quá trình chọn lọc với PPT là các dòng chuyển gen, có sự gắn chèn của gen chuyển trong bộ gen cây nhận và có sự biểu hiện của gen giúp cây kháng với thuốc diệt cỏ.

Kết quả thu nhận hạt của các dòng chuyển gen

Trong 5 dòng dương tính PCR, Southern blot và kháng Basta chỉ 2 dòng D2 và D8 có khả năng đậu trái (hình 4), các dòng còn lại (D3, D5, D9) không tạo trái, mà sau một thời gian phát triển lá vàng, rụng, cây chết dần. Trái của hai dòng D2 và D8 chín, vỏ trái khô, màu vàng sau khoảng 4 tháng. Dòng D2 thu được hai trái, mỗi trái 1 hạt, gồm 1 hạt màu đỏ (D2-1) và 1 hạt màu trắng (D2-2). Dòng D8 thu được 1 trái hai hạt, gồm 1 hạt đỏ (D8-1) và 1 hạt trắng (D8-2) (hình 5). Màu đỏ của các hạt thể hiện đậm và rõ ở phần rễ mầm, nhạt hơn ở phần phôi nhũ. Nghiên cứu chuyển gen tạo astaxanthin trên nhiều cây khác nhau cho thấy sự tích lũy astaxanthin trên các bộ phận của cây chuyển gen dẫn đến màu của các bộ phận này chuyển sang đỏ như ở bắp, táo... (Farré *et al.*, 2016; Jia *et al.*, 2019).

Hạt của hai dòng D2 và D8 được tiếp tục gieo trồng trong vườn ươm để kiểm tra, theo dõi khả năng nảy mầm, sinh trưởng, phát triển, sinh sản của cây so với đối chứng.

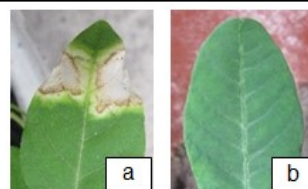
Kiểm tra sự hiện diện, biểu hiện của gen biến nạp, khả năng sinh sản và kiểu hình của các dòng T1.

Cây mọc từ hạt thu được từ các cây chuyển gen đều phát triển khá tốt, gồm 4 cây, 2 cây từ hạt trắng và 2 cây từ hạt đỏ (hình 6). Các cây này phát triển khá đồng đều, không khác biệt đáng kể so với cây đối chứng. DNA của các dòng D2-1, D2-2, D8-1, D8-2 và đối chứng được ly trích, kiểm tra sự hiện diện của các gen biến nạp bằng PCR.

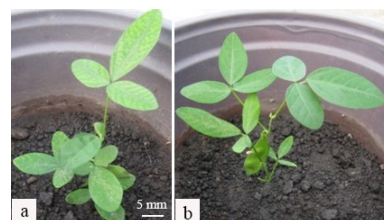
Kết quả điện di sản phẩm PCR khuếch đại các gen biến nạp sử dụng các cặp mồi đặc hiệu được thể hiện trên hình 7 cho thấy có sự hiện diện của tất cả các băng đặc hiệu của các gen *bar*, *cbfd2*, *hbfd1* và *Zm-Psy* ở dòng D2-1 và D8-1, là các dòng phát triển từ hạt đỏ. Ngược lại, ở dòng D2-2, D8-2 (dòng phát triển từ hạt trắng) và đối chứng đều không có sự hiện diện của các băng đặc hiệu, do đó không có sự hiện diện của các băng đặc hiệu, do đó không có sự hiện diện của gen biến nạp. Các kết quả PCR chứng tỏ hai dòng D2-1 và D8-1 nhận được sự di truyền các gen biến nạp từ cây bố mẹ, trong khi dòng D2-2 và D8-2 không nhận được sự di truyền.

Kiểm tra tính kháng của cây với thuốc diệt cỏ Basta

Dung dịch thuốc diệt cỏ Basta được sử dụng để quét lên mặt trên lá của các dòng D2-1, D2-2, D8-1, D8-2 và đối chứng. Kết quả quan sát sau 7 ngày cho thấy lá của 2 dòng D2-1, D8-1 vẫn xanh tốt, hầu như không bị ảnh hưởng, trong khi lá của dòng D2-2, D8-2 và đối chứng đều bị cháy khô ở vùng xử lý với Basta. Điều này chứng tỏ dòng D2-1 và D8-1 nhận được sự di truyền của gen *bar* từ cây bố mẹ, sự biểu hiện của gen này giúp cây kháng lại Basta. Dòng D2-2, D8-2 không nhận được sự di truyền gen *bar* nên không kháng được Basta, lá bị cháy khô ở vùng xử lý.



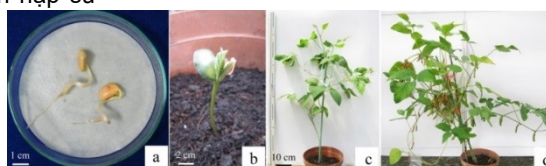
Hình 3. Lá cây đối chứng và chuyển gen sau 7 ngày quét dung dịch Basta. a: lá cây đối chứng; b: lá cây chuyển gen



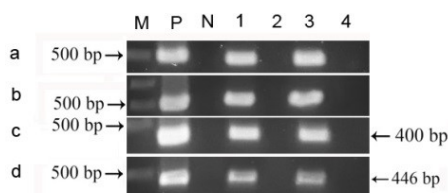
Hình 4. Dòng chuyển gen D2 (a) và D8 (b) phát triển ngoài vườn ươm



Hình 5. Hạt màu đỏ của dòng D2 và D8. 1, 2, 3: Hạt đậu tương màu trắng của cây đối chứng, dòng D2 và D8; 4, 5: Hạt đậu tương màu đỏ của dòng D2 và D8

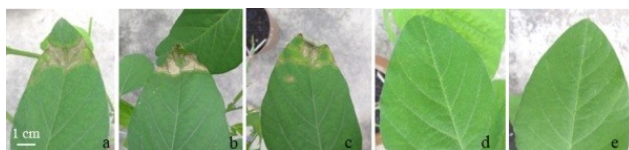


Hình 6. Các giai đoạn phát triển của cây chuyển gen trồng từ hạt. a. Hạt nảy mầm sau 4 ngày; b. cây mầm phát triển sau 7 ngày; c. cây phát triển ở giai đoạn bắt đầu ra hoa; d. cây chuyển gen ở giai đoạn trái chín.



Hình 7. Kết quả điện di sản phẩm PCR gen biến nạp ở các dòng T1. a. gen *bar*; b. gen *cbfd2*; c. gen *hbfd1*; d. gen *Zm-Psy*; M: thang chuẩn 1kb (Promega); P: đối chứng dương *pITB-AST*; N: cây đối chứng không chuyển gen; 1: D2-1; 2: D2-2; 3: D8-1; 4: D8-2

Các dòng D2-1, D2-2, D8-1, D8-2 phát triển khá tốt trong vườn ươm, không có khác biệt đáng kể về kiểu hình so với đối chứng. Hạt chín được thu hoạch sau khoảng 4 tháng, số lượng hạt được ghi nhận như sau: dòng D2-1 (93 hạt đỏ, 6 hạt trắng), dòng D2-2 (0 hạt đỏ, 102 hạt trắng), dòng D8-1 (97 hạt đỏ, 7 hạt trắng), dòng D8-2 (0 hạt đỏ, 112 hạt trắng), đối chứng (0 hạt đỏ, 109 hạt trắng). Như vậy, hạt thu được gồm hai loại màu đỏ và trắng. Trong đó, các dòng D2-2, D8-2 và đối chứng chỉ thu được hạt trắng, dòng D2-1 và D8-1 thu được cả hạt đỏ và trắng. Hạt màu trắng là kiểu màu của hạt đối chứng, không chuyển gen. Như đã phân tích bằng PCR và tính kháng Basta, hai dòng D2-2, D8-2 không mang gen biến nạp nên toàn bộ hạt của các dòng này đều màu trắng hoàn toàn phù hợp với kết quả phân tích trước đó. Hai dòng D2-1, D8-1 nhận được sự di truyền của gen biến nạp, các cây này tạo được hạt màu đỏ, chứng tỏ có sự di truyền gen chuyển cho thế hệ sau. Ngoài ra, các dòng này cũng tạo hạt màu trắng, điều này có thể do đây chưa phải các dòng đồng hợp tử nên có sự phân ly gen biến nạp ở thế hệ tiếp theo. Màu đỏ hạt của dòng D2-1 và D8-1 đều có sự biến thiên từ nhạt đến đậm.



Hình 8. Thử nghiệm quét Basta trên lá cây chuyển gen và đối chứng. a. cây đối chứng; b. dòng D2-2; c. dòng D8-2; d. dòng D2-1; e. dòng D8-1

Kiểm tra khả năng di truyền và biểu hiện của gen biến nạp ở thế hệ T2

Ở mỗi dòng gieo tất cả các hạt màu trắng, 3 hạt màu đỏ đậm và 3 hạt màu đỏ nhạt trong giấy thấm nước bổ sung 100 mg/L PPT. Kết quả sau 4 ngày chỉ những hạt màu đỏ có khả năng nảy mầm, các hạt trắng chết dần, không nảy mầm. Điều này cho thấy, chỉ những hạt màu đỏ có mang gen biến nạp (gen *bar*), sự biểu hiện của gen này giúp hạt có khả năng kháng và nảy mầm trong môi trường có 100 mg/L PPT. Các hạt nảy mầm được trồng trong chậu đất ngoài vườn ươm. Sau khoảng 4 tháng, thu nhận hạt với kết quả như sau: tất cả các cây trồng từ hạt đỏ đậm đều tạo hạt màu đỏ với màu đậm nhạt khác nhau. Hạt của các cây trồng từ hạt đỏ nhạt có sự phân ly màu: trắng, đỏ nhạt, đỏ đậm.

Các kết quả ghi nhận được cho thấy đã có sự di truyền của gen biến nạp từ thế hệ T1 đến T2, tất cả các cây T2 đều tạo được hạt màu đỏ. Ngoài ra, những cây phát triển từ hạt đỏ đậm không có sự phân ly màu sắc hạt (đỏ, trắng) ở thế hệ sau, những cây phát triển từ hạt đỏ nhạt có sự phân ly màu sắc hạt (đỏ, trắng) ở thế hệ sau. Điều này có thể do số lượng bản sao của gen biến nạp trong cây bố mẹ cũng như vị trí gắn chèn của gen biến nạp trong nhiễm sắc thể cây bố mẹ. Tuy nhiên, màu sắc hạt có thể được sử dụng để hỗ trợ việc xác định thể đồng hợp tử, từ đó tạo dòng di truyền ổn định gen biến nạp, bằng việc gieo các hạt màu đỏ đậm nhất qua nhiều thế hệ để thu nhận dòng tạo được các hạt đỏ đậm, đồng đều.

Phân tích hàm lượng astaxanthin trong hạt chuyển gen

Mẫu ly trích từ hạt của hai dòng D2-1 và D8-1 đều có sự hiện diện peak ở tỉ số khối lượng/điện tích (m/z) đặc trưng của astaxanthin là 597,39 (Régnier *et al.*, 2015), đồng thời ở mẫu đối chứng không chuyển gen không có sự hiện diện của peak này, chứng tỏ trong hạt của hai dòng D2-1 và D8-1 đều có astaxanthin với hàm lượng lần lượt là 0,31 và 0,77 µg/g. Hàm lượng astaxanthin trong hạt của hai dòng D2-1 và D8-1 đều tương đối thấp so với kết quả trên đậu tương (2-7 µg/g) của Pierce và đồng tác giả (2015) cũng như trên một số đối tượng khác như bắp đạt 16,77 µg/g (Farré *et al.*, 2016); gạo với 16,23 µg/g (Zhu *et al.* (2018)... Điều này có thể do nhiều nguyên nhân như gen biến nạp được sử dụng, giống dùng để chuyển gen và vị trí gắn chèn của gen. Hàm lượng β-carotene trong hạt của cây đối chứng không chuyển gen MTĐ 176 tương đối thấp (1,76 µg/g, thực hiện bởi trung tâm sắc ký Hải Đăng bằng phương pháp HPLC), có thể dẫn đến cơ chất ban đầu cần cho sự chuyển hóa chưa đủ nhiều, làm giảm hiệu quả tạo astaxanthin. Các nghiên cứu trên ngoài sử dụng gen mã hóa enzyme phytoene synthase còn sử dụng gen mã hóa các enzyme khác như phytoene desaturase, hoặc knock-down gen mã hóa lycopene ε-cyclase nhằm tăng cường con đường tổng hợp β-carotene, từ đó làm giàu cơ chất ban đầu cho sự tổng hợp astaxanthin (Farré *et al.*, 2016; Zhu *et al.*, 2018). Đây có thể là định hướng giúp cải tiến, nâng cao hơn khả năng tổng hợp astaxanthin của đậu tương. Ngoài ra, sự biểu hiện của gen còn phụ thuộc vào tương tác giữa gen biến nạp ở vị trí chèn vào nhiễm sắc thể và bộ gen của cây chủ, do đó việc tạo thêm nhiều dòng chuyển gen có thể giúp tìm được dòng có khả năng tổng hợp astaxanthin tối ưu hơn.



Hình 9. Các hạt chuyển gen biểu hiện màu đỏ không đồng đều. 1. Hạt màu trắng cây đối chứng; 2. Hạt màu trắng cây chuyển gen; 3. Hạt màu đỏ nhạt cây chuyển gen; 4. Hạt màu đỏ đậm cây chuyển gen



Hình 10. Hạt của các dòng chuyển gen T2. a. Tất cả các hạt đều màu đỏ của dòng D2-1-1; b. Hạt màu đỏ (1) và màu trắng (2) của dòng D2-1-4

KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã tạo được hai dòng đậu tương chuyển gen có khả năng sản xuất astaxanthin chuyên biệt ở hạt. Các dòng này có khả năng di truyền và biểu hiện gen bền vững qua nhiều thế hệ. Hàm lượng astaxanthin trong hạt của hai dòng chuyển gen thế hệ T1 được xác định lần lượt 0,31 và 0,77 µg/g. Như vậy, nghiên cứu đã cho thấy việc chuyển các gen liên quan đến con đường chuyển hóa tạo astaxanthin từ cây hoa *Adonis aestivalis* vào đậu tương có thể giúp cây đậu tương có khả năng sản xuất astaxanthin. Hàm lượng astaxanthin có thể được nâng cao bằng cách chuyển thêm các gen giúp tối ưu hơn con đường chuyển hóa.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Arun M, Subramanyam K, Mariashibu TS, Thebora J, Shivanandhan G, Manickavasagam M, Ganapathi A (2015). Application of sonication in combination with vacuum infiltration enhances the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in Indian soybean cultivars. *Appl Biochem Biotechnol* 175(4): 2266-2287.
- Cunningham FX, Gantt E (2011). Elucidation of the pathway to astaxanthin in the flowers of *Adonis aestivalis*. *Plant Cell* 23(8): 3055-3069.
- Buckner B, San Miguel P, Janick-Buckner D, Bennetzen JL (1996). The *y1* gene of *maize* codes for phytoene synthase. *Genetics*, 143(1): 479-488.
- Farré G, Perez-Fons L, Decourcelle M, Breitenbach J, Hem S, Zhu C, Capell T, Christou P, Fraser PD, Sandmann G (2016). Metabolic engineering of astaxanthin biosynthesis in *maize* endosperm and characterization of a prototype high oil hybrid. *Transgenic Res* 25(4): 477-489.
- Fassett RG, Coombes JS (2011). Astaxanthin: a potential therapeutic agent in cardiovascular disease. *Marine drugs*, 9(3): 447-465.
- Goswami G, Chaudhuri S, Dutta D (2010). The present perspective of astaxanthin with reference to biosynthesis and pharmacological importance. *World J Microbiol Biotechnol* 26(11): 1925-1939.
- Huang J-C, Zhong Y-J, Liu J, Sandmann G, Chen F (2013). Metabolic engineering of tomato for high-yield production of astaxanthin. *Metab Eng* 17: 59-67.
- Jia D, Fan L, Shen J, Qin S, Li F, Yuan Y (2019). Genetic transformation of the astaxanthin biosynthetic genes *bkt* and *crtR-B* into apple tree to increase photooxidation resistance. *Sci Hort* 243: 428-433.
- Kim J, Smith JJ, Tian L, DellaPenna D (2009). The evolution and function of carotenoid hydroxylases in *Arabidopsis*. *Plant cell physiol*, 50(3): 463-479.
- Mariashibu TS, Subramanyam K, Arun M, Mayavan S, Rajesh M, Thebora J, Manickavasagam M, Ganapathi A (2012). Vacuum infiltration enhances the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation in Indian soybean cultivars. *Acta Physiol Plant* 35(1): 41-54.
- Molino A, Rimauro J, Casella P, Cerbone A, Larocca V, Chianese S, Karatza D, Mehariya S, Ferraro A, Hristoforou E (2018). Extraction of astaxanthin from microalga *Haematococcus pluvialis* in red phase by using generally recognized as safe solvents and accelerated extraction. *J Biotechnol* 283: 51-61.
- Olhoft PM, Fligel LE, Donovan CM, Somers DA (2003). Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method. *Planta* 216(5): 723-735.
- Paz MM, Martinez JC, Kalvig AB, Fonger TM, Wang K (2006). Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation. *Plant Cell Rep* 25(3): 206-213.
- Pierce EC, LaFayette PR, Ortega MA, Joyce BL, Kopsell DA, Parrott WA (2015). Ketocarotenoid production in soybean seeds through metabolic engineering. *PLoS One* 10(9): e0138196.
- Régnier P, Bastias J, Rodriguez-Ruiz V, Caballero-Casero N, Caballo C, Sicilia D, Fuentes A, Maire M, Crepin M, Letourneur D (2015). Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis* prevents oxidative stress on human endothelial cells without toxicity. *Mar Drugs* 13(5): 2857-2874.
- Shah M, Mahfuzur R, Liang Y, Cheng JJ, Daroch M (2016). Astaxanthin-producing green microalga *Haematococcus pluvialis*: from single cell to high value commercial products. *Front Plant Sci* 7: 531.
- Zhu Q, Zeng D, Yu S, Cui C, Li J, Li H, Chen J, Zhang R, Zhao X, Chen L (2018). From golden rice to a STARice: bioengineering Astaxanthin biosynthesis in rice endosperm. *Mol Plant* 11(12): 1440-1448.

AGROBACTERIUM TUMEFACIENS MEDIATED GENE TRANSFORMATION OF SOYBEAN FOR SEED-SPECIFIC ASTAXANTHIN PRODUCTION

**Hoang Van Duong^{1,2}, Phan Tuong Loc¹, Le Tan Duc¹,
Nguyen Huynh Cam Tu¹, Tran Thi Ngoc Ha¹, Nguyen Huu Ho¹**

¹ *Institute Tropical of Biology, Vietnam Academy of Science and Technology*

² *Graduate University of Science and Technology, Vietnam Academy of Science and Technology*

SUMMARY

Soybean is one of the most popular and important crops in the world agriculture. Therefore, it receives a lot of attention in breeding and improving its productivity and quality. Currently, genetically modified soybeans are one of the major biotech crops grown in many countries. Biological synthesis of astaxanthin in soybean by genetic transformation will help improve the value of beans, creating products with high potential for application. In this study, various methods of wounding explants including scalpels, scalpels combined with vacuum and ultrasonic were used to test the effect of each method on gene transfer efficiency. Results showed that the

incorporation of vacuum or ultrasonic waves significantly increased the efficiency of gene transfer into cotyledon node. The study generated transgenic soybean lines that produce astaxanthin specially in seeds. These lines were tested by PCR, Southern blot and resistance to Basta herbicide. The seeds of the transgenic soybean lines had color separation, the red transgenic seeds and the white non-transgenic seeds. The astaxanthin content in seeds of the two transgenic lines determined by HPLC-MS method yielded respectively 0.31 and 0.77 $\mu\text{g/g}$. Transgenic soybean lines developed from seeds had normal growth and development, not significantly different from the control. All transgenic T1 lines produced red transgenic T2 seeds. Thus, the study has created specialized astaxanthin-producing soybean lines in seeds that have shown stable performance over generations.

Keywords: Agrobacterium tumefaciens, astaxanthin, cotyledon node, half-seed, soybean, transformation.