

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG KHÁNG THUỐC DIỆT CỎ VÀ KHÁNG SÂU CỦA DÒNG ĐẬU TƯƠNG CHUYỂN GIEN

Lã Văn Hiền¹, Nguyễn Tiến Dũng¹, Ngô Xuân Bình¹

TÓM TẮT

Đánh giá hiệu quả chuyển gen được tiến hành từ thế hệ T0 đến T3 được trồng ở nhà lưới và trên đồng ruộng. Khả năng kháng thuốc diệt cỏ dựa trên phương pháp kiểm tra PPT và thuốc diệt cỏ Basta 0,3%. Khả năng kháng sâu được tiến hành theo dõi trên đồng ruộng và lây nhiễm nhân tạo trong phòng thí nghiệm. Kết quả cho thấy trong số 25 cây T0 được đánh giá có 13 cây kháng PPT. Thế hệ T1, T2 và T3 được phun thuốc basta 0,3% sau 3-5 ngày có tỷ lệ cây kháng thuốc diệt cỏ lần lượt 92,8%, 91,3% và 82,2%. Khả năng kháng sâu có sự biến động ở các dòng đậu tương chuyển gen và đối chứng qua các vụ trồng khác nhau. Thế hệ T1 không có sâu cuốn lá xuất hiện, sâu đục quả chiếm 3,74%. Thế hệ T2 và T3 có tỷ lệ cây bị sâu cuốn lá trung bình 2,45% và 5,10%, tỷ lệ cây bị sâu đục quả trung bình là 3,56% và 4,62%. Kết quả kiểm tra PCR cho thấy gen kháng thuốc diệt cỏ *bar* có kích thước 408 bp ở thế hệ T0 đến T2 và gen *cry1Ac* kích thước 504 bp có mặt ở T0, T1 ở các cây được kiểm tra.

Từ khóa: *Bar*, *cry1Ac*, chuyển gen, đậu tương, kháng sâu.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Các nghiên cứu chuyển gen ở cây đậu tương đã có những kết quả bước đầu, tập trung chủ yếu khả năng kháng thuốc diệt cỏ glufosinat (Olhoft P. M. *et al.*, 2001; Margie M. Paz *et al.*, 2004). Trong đó một số giống đậu tương đã được sử dụng phổ biến trong nhiều nghiên cứu của các tác giả như Bert, Lambert, Maverik, Thorne, Jack, Pecking và Williams 82 (Olhoft P. M. *et al.*, 2001; Margine M. Paz *et al.*, 2004, 2006; Trần Thị Cúc Hòa, 2008). Trên thế giới, các giống đậu tương chuyển gen đã được thương mại hóa, trồng rộng ở Mỹ, Brazil và một số nước khác với các giống đậu tương mang tính trạng kháng thuốc diệt cỏ và kháng sâu đã được chuyển vào đậu tương. Ba giống đậu tương GMO bao gồm INTACRR2PRO[®]soybeans, Roundup Ready 2 Yield[®]soybeans và Vistive[®]Gold soybeans đã được Monsanto thương mại hóa. Trong đó giống đậu tương INTACRR2PRO[®]soybeans có khả năng kháng sâu ăn lá, sâu đục thân *Helicoverpa armigera* và có khả năng kháng thuốc diệt cỏ glyphosat (www.Monsanto.com). Ở Việt Nam, các giống đậu tương MTĐ176, HL202 đã được thử nghiệm chuyển gen *bar* và *soycry1Ac* (Trần Thị Cúc Hòa, 2008), chuyển gen *bar* và gen kháng hạn *GmMYB* vào giống DT22 (Nguyễn Văn Đồng *et al.*, 2013). Ở nghiên cứu trước, chúng tôi đã tiến hành thăm dò khả năng tái sinh và tiếp nhận gen của hơn 20 giống

đậu tương của Việt Nam, bao gồm: ĐVN9, VX93, DT84, DT90, DDT22, DT2003, DT2008... và nhiều 'giống địa phương khác (Nguyễn Tiến Dũng *et al.*, 2010, 2011). Tuy nhiên ở nước ta các giống đậu tương chuyển gen mới dừng lại ở quy mô phòng thí nghiệm hoặc trong điều kiện nhà kính với mức độ khảo nghiệm nhỏ, chưa có giống đậu tương chuyển gen thương mại.

Đậu tương thuộc nhóm cây dễ mất cảm, bên cạnh những yếu tố kỹ thuật như canh tác, cỏ dại, sâu bệnh là một trong những nguyên nhân chính làm cho năng suất và sản lượng của đậu tương nước ta còn thấp (Ngô Thế Dân *et al.*, 1999). Một trong những giải pháp nghiên cứu tăng cường khả năng kháng sâu, kháng thuốc diệt cỏ là sử dụng kỹ thuật chuyển gen trên cây đậu tương được quan tâm (Zhang Z *et al.*, 1999; Olhoft P. M. *et al.*, 2001; Margine M. Paz *et al.*, 2005; Trần Thị Cúc Hòa, 2008; Nguyễn Tiến Dũng *et al.*, 2011; Nguyễn Văn Đồng *et al.*, 2013). Đồng thời, để cây trồng chuyển gen được ứng dụng và sản xuất trên diện rộng cần có các quá trình đánh giá kiểm tra. Bài báo này trình bày kết quả "Đánh giá khả năng kháng thuốc diệt cỏ và kháng sâu của dòng đậu tương chuyển gen".

2. VẬT LIỆU, PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Vật liệu là cây đậu tương chuyển gen thế hệ T0, T1, T2, T3 được trồng tại vườn thí nghiệm Trường Đại học Nông Lâm Thái Nguyên ở vụ đông, xuân, hè trong năm 2011 - 2013.

¹ Khoa CNSH-CNTP, Đại học Nông Lâm Thái Nguyên

Hóa chất kiểm tra khả năng kháng thuốc diệt cỏ DL-Phosphinothricin (PPT, Sigma) và Basta (Bayer, Đức).

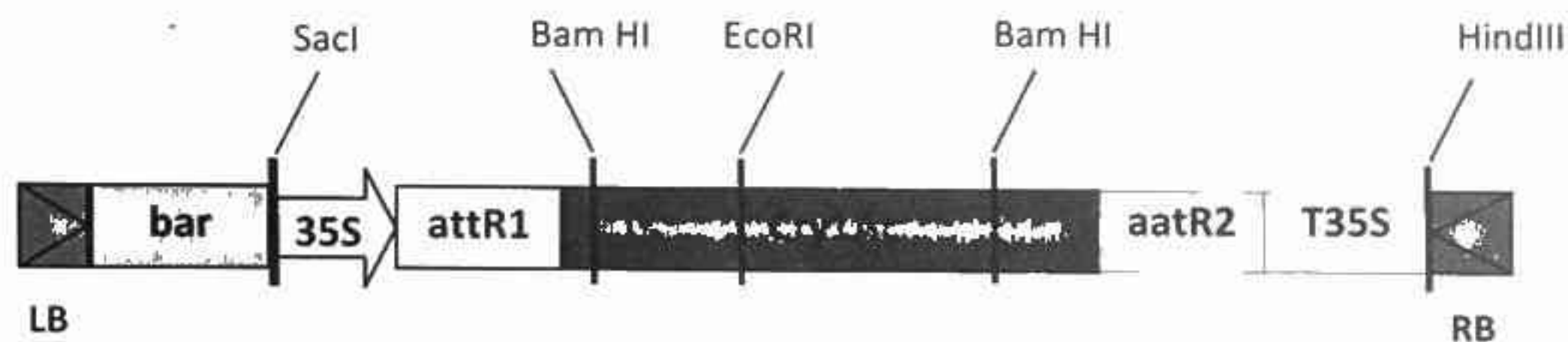
Hóa chất dùng trong phản ứng PCR và điện di: Buffer PCR 10X (+Mg), dNTP, Ladder 1 kb của Hãng

Fementas, Taq polymeraza (Bioneer), agarosa (Biobasic, Canada).

Mỗi sử dụng để nhân đoạn gen *bar*, *cryIAC* do Hãng Cosmo cung cấp, có trình tự như sau:

Bảng 1. Trình tự cặp mồi được sử dụng trong nghiên cứu

Tên mồi	Trình tự nucleotit (5' - 3')	Kích thước sản phẩm PCR
<i>cryIA(c1) - F</i>	ACG TTA TTG TGG AGC GGC GT	544 bp
<i>cryIA(c1) - R</i>	CCT CAG CGT GCT TCG AGA CGT	
<i>bar - F</i>	TCC GTA CCG AGC CGC AGG AA	408 bp
<i>bar - R</i>	CCG GCA GGC TGA AGT CCA GC	



Hình 1. Cấu trúc đoạn T-ADN mang gen *bar* và gen *cryIAC*

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp trồng cây bố trí thí nghiệm

Cây đậu tương chuyển gen thế hệ T0 sau khi tạo ra được trồng trong nhà lưới, chăm sóc và cung cấp dinh dưỡng đầy đủ. Điều kiện nhà lưới 30°C, ánh sáng 2000 - 2500 lux. Dòng T1, T2, T3 được trồng trên ruộng thí nghiệm, mỗi cây được kí hiệu số riêng biệt. Tiến hành gieo trồng, chăm sóc tuân theo Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về “*Khảo nghiệm giá trị canh tác và sử dụng của giống đậu tương*” QCVN 01-58/2011 của Bộ NN&PTNT.

2.2.2. Phương pháp kiểm tra khả năng kháng thuốc diệt cỏ

Dựa trên nghiên cứu đánh giá cây đậu tương chuyển gen của Margine M. Paz *et al.* (2005) ở giai đoạn 4 - 5 lá thật và giai đoạn quả chắc xanh được kiểm tra bằng PPT 0,3, 0,5, 0,7 và 1,0 mg/ml và thuốc diệt cỏ basta 0,3%. Các lá ở vị trí thứ 3 (từ dưới gốc lên) của cây được đánh dấu kiểm tra bằng cách vạch một đường ngang lá (hình 2b). Dùng bông tẩm PPT tiến hành quét một đường ngang lá theo đường đã vạch sẵn. Sau 3-5 ngày xác nhận biểu hiện trên lá, lá có phần bị vàng khô theo đúng vị trí quét thuốc PPT, điều đó chứng tỏ cây không có khả năng kháng thuốc diệt cỏ. Lá của cây kháng thuốc diệt cỏ vẫn duy trì được màu xanh (hình 2b, 2f, 2g).

Tương tự tiến hành phun thuốc diệt cỏ basta 0,3% ở cả giai đoạn 4-5 lá và quả chắc xanh (hình 2f,

2g). Tiến hành pha 16 lít thuốc basta 0,3% phun cho 720 m². Sau 3-5 ngày quan sát biểu hiện của lá, ghi nhận những cây kháng thuốc diệt cỏ không có biểu hiện vàng lá.

$$\text{Tỷ lệ cây kháng thuốc diệt cỏ (\%)} = \frac{\sum \text{cây sống}}{\sum \text{cây ban đầu}} \times 100$$

2.2.3. Phương pháp lây nhiễm sâu nhân tạo

Đánh giá khả năng kháng sâu dựa trên phương pháp của Walker D. R. *et al.* (2000). Các cây T1, T2, T3 được trồng trên ruộng thí nghiệm, ở giai đoạn 4-5 lá được theo dõi sâu cuốn lá, cây không có biểu hiện sâu hại được thu mẫu lá để lây nhiễm nhân tạo ở phòng thí nghiệm.

Đối với sâu cuốn lá được thu thập từ đồng ruộng. Theo dõi những cây có biểu hiện sâu cuốn lá, bắt những sâu non vừa nở từ trứng sâu. Sau đó sâu non tiếp tục được nuôi ở hộp nhựa kín có nguồn thức ăn bổ sung. Sau 1 tuần, lựa chọn sâu đồng đều về kích thước để thả vào đĩa petri đã có lá của cây đậu tương chuyển gen được thu mẫu ngoài đồng ruộng (hình 2- i,k,m,l). Để tối, 27°C ở phòng thí nghiệm, sau 24 giờ đem ra quan sát, ghi nhận kết quả. Đối với sâu đục quả được theo dõi trên đồng ruộng.

2.2.4. Phương pháp kiểm tra kết quả chuyển gen bằng PCR

Thu mẫu lá và tiến hành tách chiết ADN theo phương pháp CTAB của Saghai Maroof *et al.* (1984)

và phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu gen *cryIAC* (*bar*) có thể tích 20 µl/phản ứng. Thành phần phản ứng PCR gồm: 2 µl PCR Buffer 10X (+MgCl₂) + 1,0 µl dNTPs (2,5 mM) + 0,5 µl mồi xuôi *cryIAC* (hoặc gen *bar*) (10 picromol/µl) + 0,5 µl mồi ngược *cryIAC* (hoặc gen *bar*) (10 picromol/µl) + 0,2 µl Taq ADN polymeraza (5 U/µl) + 2,0 µl ADN khuôn + 13,8 µl H₂O khử ion. Phản ứng PCR diễn ra ở máy luân nhiệt TE thermoCycler- 320 với chu trình nhiệt khởi đầu ở 95°C trong 5 phút, 35 chu kỳ tiếp theo, mỗi chu kỳ gồm 3 giai đoạn (biến tính 95°C trong 30 giây; gắn mồi 55°C trong 45 giây với gen *cryIAC* (30 giây với gen *bar*); kéo dài 72°C trong 60 giây (30 giây với gen *bar*) và kết thúc kéo dài 72°C trong 2 phút. Ủ bảo quản mẫu ở 4°C. Điện di sản phẩm PCR trên gel agarosa 1%. Hiện thị kết quả trên máy UV-Wise L50.

2.2.5. Phương pháp xử lý số liệu

Kết quả thí nghiệm được xử lý thống kê bằng phần mềm Excel 2010.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Khả năng kháng thuốc diệt cỏ

Cây đậu tương chuyển gen thể hệ T₀ được tạo ra bằng phương pháp “hafl seed” của Margine M. Paz *et al.* (2005). Đoạn T-ADN mang gen chỉ thị chọn lọc *bar* (gen kháng thuốc diệt cỏ) và gen kháng sâu *cryIAC* được chuyển vào cây đậu tương.



Hình 2. Tạo dòng đậu tương chuyển gen T₀ (VX93)

A – Cây T₀; B – Kiểm tra PPT 0,7 mg/ml. C, D – Dòng T₀ trong nhà lưới; E- Hạt dòng T₀ (VX93)

Cây T₀ được đánh giá khả năng kháng thuốc diệt cỏ thông qua kiểm tra PPT 0,7 mg/ml. Kết quả được thể hiện qua hình 1 và bảng 2. Trong 28 cây T₀ tạo ra được kiểm tra bằng PPT ở nồng độ 0,3 - 1,0 mg/l cho kết quả có 13 cây có khả năng kháng PPT sau 3 ngày kiểm tra. Giống VX93 có số cây sống 5/7 cây và giống ĐVN9 là 4/7 cây đánh giá. KW có tỷ lệ cây sống thấp 4/10 cây so với các giống chuyển gen còn lại. Trong 9 cây đối chứng đều không có khả năng sống khi kiểm tra PPT 0,3 mg/ml. Các cây sống được chăm sóc, thu hạt để tiếp tục đánh giá ở các thế hệ tiếp theo.

Bảng 2. Khả năng kháng PPT của cây chuyển gen T₀ (vụ hè 2011)

Gen chuyển vào cây	Giống	Số cây đưa ra trồng	Số cây đánh giá	Số cây kháng PPT ở nồng độ sau 3 ngày thử (mg/ml)			
				0,3	0,5	0,7	1,0
<i>cryIA(c)-M#2</i>	DT84	1	0	0	0	0	0
	ĐVN9	7	7	7	4	4	4
	VX93	8	7	5	5	5	5
	KW	12	11	10	4	4	4
Đối chứng			9	0	0	0	0
TB cây chuyển gen		28	25	22	13	13	13

Bảng 3 thể hiện kết quả đánh giá khả năng kháng thuốc diệt cỏ ở các thế hệ T₁, T₂, T₃. Thế hệ T₁ được đánh giá trên hai giống đậu tương chuyển gen VX93, ĐVN9. Giống VX93 có tỷ lệ cây kháng cao nhất 84/84 cây đánh giá, đạt tỷ lệ 100%. VX93 chuyển gen được đánh giá có biểu hiện kháng rất tốt, lá vẫn giữ được màu xanh, cây sinh trưởng bình thường. Giống ĐVN9 chuyển gen đánh giá 14 cây,

kết quả có 7/14 cây có biểu hiện kháng được PPT 0,3 mg/ml với tỷ lệ 50%. Tiếp tục đánh giá VX93 và ĐVN9 ở thế hệ T₂. ĐVN9 kiểm tra khả năng kháng thuốc diệt cỏ có 33/191 cây và VX93 có 2057/2097, cây kháng thuốc diệt cỏ basta 0,3%, ứng với tỷ lệ cây kháng 17,3% và 98%. Biểu hiện của cây không kháng thuốc diệt cỏ ở thế hệ T₂ được ghi nhận ở hình (hình 2f,g). Tương tự thế hệ T₃ được đánh giá trên giống

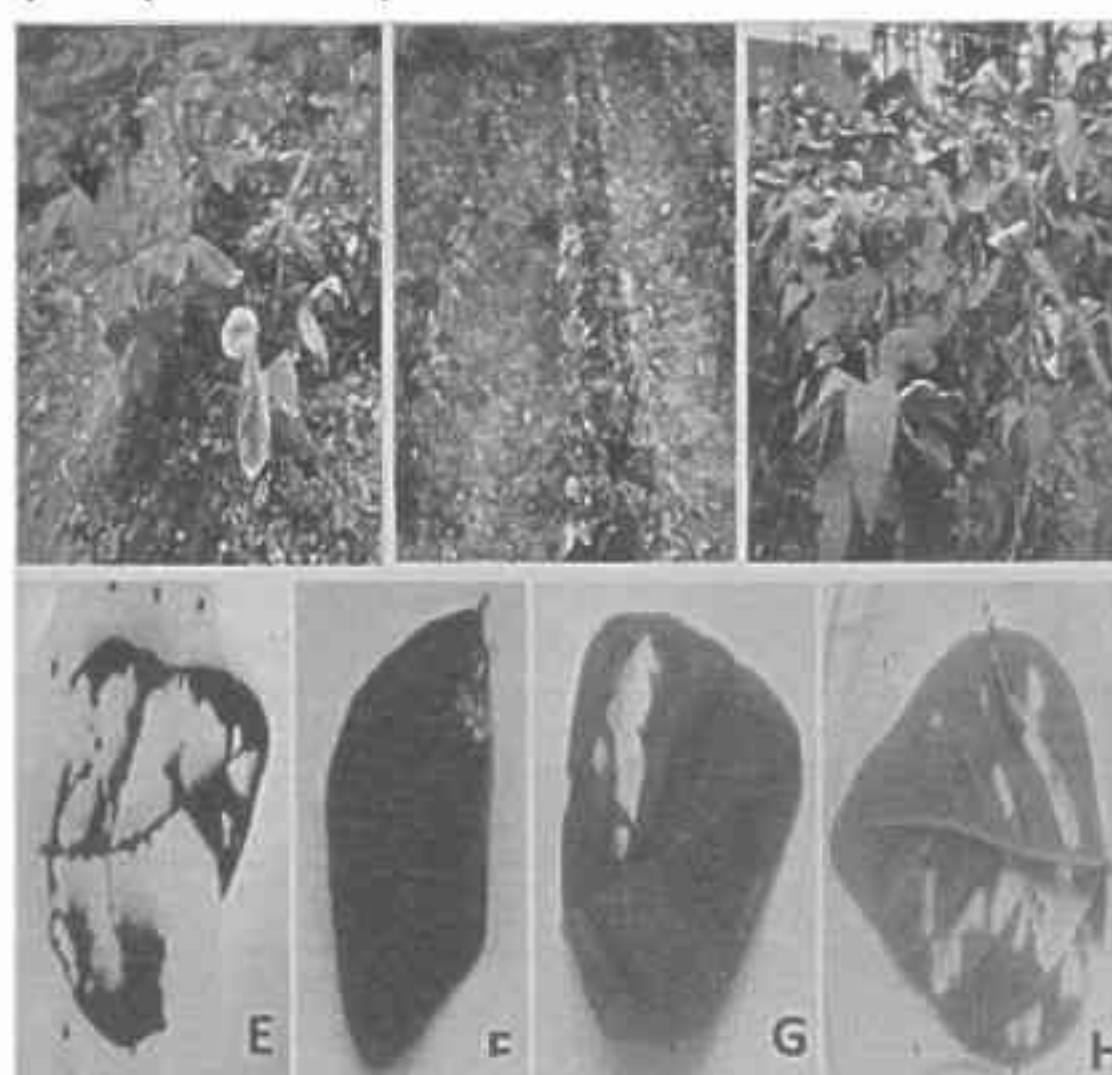
ĐVN9 và VX93, cho kết quả ở giống ĐVN9 có 6/142 cây có khả năng kháng thuốc diệt cỏ, ứng với tỷ lệ 4,2%. Tuy nhiên, ở giống VX93 vẫn duy trì được khả năng kháng cao 94,2%, có 873/927 cây.

Bảng 3. Khả năng kháng thuốc diệt cỏ basta 0,3% của đậu tương chuyển gen thế hệ T1 đến T3

Giống	Số cây đánh giá	Số cây kháng thuốc diệt cỏ Basta 0,3%	Số cây không kháng thuốc diệt cỏ Basta 0,3%	Tỷ lệ kháng (%)
Thế hệ T1 (vụ đông 2011)				
ĐVN9	14	7	7	50,0
ĐVN9 (đ/c)	14	0	14	0,0
VX93	84	84	0	100,0
VX93 (đ/c)	84	0	84	0,0
TB chuyển gen	98	91	7	92,8
Thế hệ T2 (vụ hè 2012)				
ĐVN9	191	33	158	17,3
ĐVN9 (đ/c)	191	0	191	0,0
VX93	2097	2057	40	98,0
VX93 (đ/c)	2097	0	2097	0,0
TB chuyển gen	2288	2090	198	91,3
Thế hệ T3 (vụ xuân 2013)				
ĐVN9	142	6	136	4,2
ĐVN9 (đ/c)	142	0	191	0,0
VX93	927	873	54	94,2
VX93 (đ/c)	927	0	927	0,0
TB chuyển gen	1069	879	54	82,2

Sự khác biệt về khả năng kháng thuốc diệt cỏ được thể hiện thông qua biểu hiện của bộ lá, với cây không có khả năng kháng thuốc diệt cỏ lá chuyển sang màu vàng rõ rệt sau 3-5 ngày kiểm tra PPT 0,3 mg/ml hoặc phun thuốc basta 0,3% và cây kháng được vẫn giữ được màu xanh, sinh trưởng bình thường (hình 2f,g). Kết quả đánh giá trên đồng ruộng cho thấy khả năng kháng thuốc diệt cỏ của giống VX93 cho kết quả duy trì ở mức cao 100% ở T1, 98% ở T2 và 94,2% ở T3. Mặc dù, số cây kháng (tương ứng với tỷ lệ cây kháng) có sự suy giảm qua các thế hệ, được thể hiện rõ ở giống ĐVN9 lần lượt có tỷ lệ cây kháng ở thế hệ T1 50%, đến T2 17,3% và T3 4,2%. Do vậy, khả năng kháng thuốc diệt cỏ của các giống đánh giá có sự khác nhau rõ rệt về số cây kháng, khả năng duy trì kháng thuốc diệt cỏ trên đồng ruộng.

Kết quả duy trì gen *bar* kháng thuốc diệt cỏ qua các thế hệ được thể hiện ở hình 3A.



Hình 3. Kết quả đánh giá khả năng kháng thuốc diệt cỏ và kháng sâu trong điều kiện lây nhiễm nhân tạo.

A, B, C – Kiểm tra khả năng kháng thuốc diệt cỏ Basta 0,3% (A – Thế hệ T1 giai đoạn 5 lá; B – Thế hệ T2; C – Thế hệ T3 giai đoạn quả chắc xanh), E, F, G, H – Kết quả lây nhiễm sâu nhân tạo sau 24 giờ để kiểm tra khả năng kháng sâu cuốn lá (E – Đối chứng; F – Lá cây T1; G – Lá cây T2; H – Lá cây T3).

3.2. Khả năng kháng sâu

Bên cạnh đánh giá hiệu quả kháng thuốc diệt cỏ, yếu tố kháng sâu cũng được đánh giá đồng thời. Các cây T0 được trồng và chăm sóc trong nhà lưới, nên các loại sâu gây hại được kiểm soát chặt chẽ. Kết quả theo dõi sâu hại chính tiến hành ở thế hệ T1 đến T3, được thể hiện rõ ở bảng 4. Kết quả theo dõi và đánh giá sơ bộ khả năng xuất hiện hai loại sâu hại chính trên dòng đậu tương T1 (sâu cuốn lá và sâu đục quả) cho thấy, phần lớn các dòng đậu tương, bao gồm các dòng chuyển gen và đối chứng, không thấy xuất hiện sâu cuốn lá. Sâu cuốn lá chỉ được ghi nhận trên một cây duy nhất trong số 14 cây giống ĐVN9 đối chứng, chiếm 7,14%.

Sâu đục quả xuất hiện ở một số dòng chuyển gen, trong đó dòng chuyển gen ĐVN9 và giống đối chứng có tỷ lệ xuất hiện tương đối cao, lần lượt là 14,29% và 28,57%. Dòng chuyển gen VX93 có tỷ lệ sâu đục quả thấp hơn (1,19%) (bảng 4). Kết quả đánh giá sơ bộ hai đối tượng sâu hại chính kể trên được tiến hành ở thế hệ cây chuyển gen thứ nhất (T1) trong điều kiện nhà lưới có mái che ở vụ thu đông.

Thế hệ T2 tiếp tục được theo dõi và ở cả thế hệ tiếp theo của các dòng đã đánh giá ở thế hệ T1. Kết quả ở bảng 4 cho thấy tỷ lệ cây bị hại do sâu cuốn lá

cao hơn so với thế hệ T1 ở cả hai giống ĐVN9 (3,9%) và VX93 (5%). Tuy nhiên khi theo dõi sâu đục quả trên giống ĐVN9 có thể thấy tỷ lệ cây bị hại giảm hơn so với thế hệ T1, tương ứng 6,73% so với 14,29%.

Ở giống VX93 tỷ lệ cây bị sâu đục quả qua theo dõi có cao hơn so với T1 (bảng 4). Tương tự, kết quả theo dõi sâu ở T3 có tỷ lệ cây bị sâu cuốn lá và sâu đục quả cao hơn so với T2 và T1 (bảng 4).

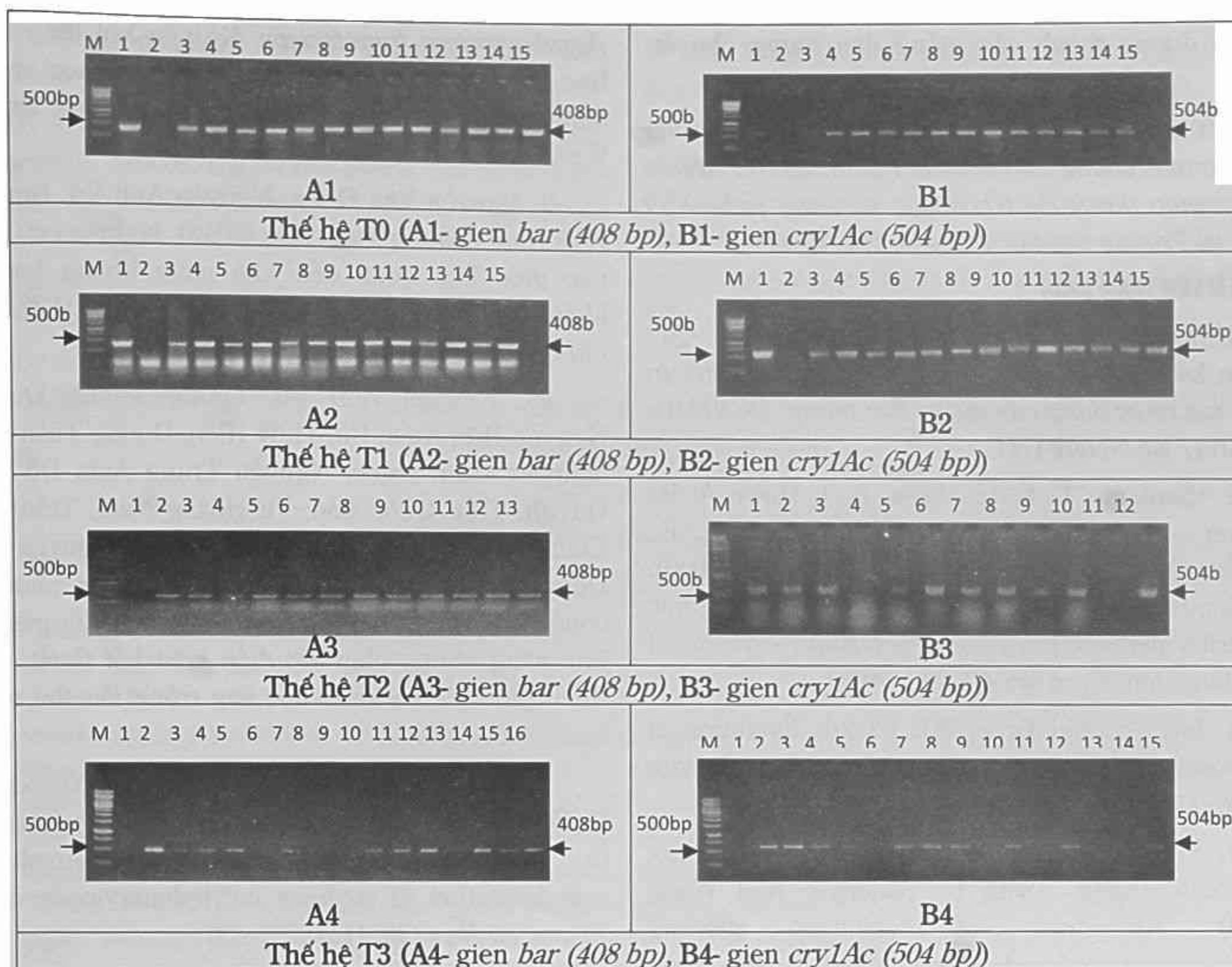
Bảng 4. Sâu hại chính trên đậu tương chuyển gen thế hệ T1 đến T3

STT	Dòng đánh giá	Số lượng cây	Sâu cuốn lá		Sâu đục quả	
			Tỷ lệ cây bị hại (%)	% số lá bị hại	Tỷ lệ cây bị hại (%)	% số quả bị hại
Thế hệ T1 (vụ đông 2011)						
1	ĐVN9	14	0,00	5,08	14,29	4,10
2	ĐVN9 (đ/c)	14	7,14	5,10	28,57	4,30
3	VX93	84	0,00	4,12	1,19	5,25
4	VX93 (đ/c)	84	0,00	4,38	2,38	5,80
TB chuyển gen		98	0,00		3,74	
Thế hệ T2 (vụ hè 2012)						
1	ĐVN9	50	3,90	4,00	6,73	1,80
2	ĐVN9 (đ/c)	50	7,03	5,11	9,01	2,00
3	VX93	100	2,00	5,30	2,40	2,10
4	VX93 (đ/c)	100	8,00	7,05	8,33	3,03
TB chuyển gen		150	2,45		3,56	
Thế hệ T3 (vụ xuân 2013)						
1	ĐVN9	50	4,01	5,31	7,05	2,10
2	ĐVN9 (đ/c)	50	9,30	8,70	8,00	4,78
3	VX93	100	6,20	4,40	6,20	3,00
4	VX93 (đ/c)	100	23,33	6,85	8,20	5,61
TB chuyển gen		150	5,10		4,62	

Quá trình theo dõi sâu hại được đánh giá trực tiếp qua các mùa vụ khác nhau trong năm 2011-2013, đảm bảo sự liên tục ở các thế hệ. Sự khác biệt được thể hiện rõ khi so sánh với giống đối chứng (không chuyển gen), cây chuyển gen có tỷ lệ cây bị hại, số lá, số quả bị hại thấp hơn so với đối chứng. Điều này cho thấy quá trình đánh giá sâu hại trên đồng ruộng phụ thuộc nhiều vào sự biểu hiện của gen *cryIAC* được chuyển vào đậu tương, mùa vụ, số lượng sâu hại phát sinh và điều kiện chăm sóc. Bên cạnh đánh giá ngoài đồng ruộng, nhiều thử nghiệm đánh giá qua lây nhiễm sâu nhân tạo trong phòng thí nghiệm cũng được tiến hành, kết quả được ghi nhận qua hình 3 (E, F, G, H). Để khẳng định được sự có mặt của gen kháng sâu *cryIAC* ở các dòng chuyển gen được thông qua kiểm tra PCR (hình 4B).

Kết quả đánh giá hiệu quả chuyển gen ở thế hệ T0 đến T3 thông qua khả năng kháng thuốc diệt cỏ Basta và kháng sâu, phân tích PCR với hai gen *bar* và gen *cryIAC* cho thấy 13 dòng chuyển gen ở thế hệ

T0 và T1 vẫn duy trì được khả năng kháng tốt, đạt tỷ lệ 100%. Phân tích PCR cây kháng thuốc diệt cỏ đều phát hiện ra đoạn gen *bar* chuyển vào. Hoạt động của gen *bar* chuyển vào đã kháng hoạt chất PPT có trong thuốc diệt cỏ Basta giúp cây sinh trưởng bình thường. Ở thế hệ T0, 13 cây có biểu hiện kháng PPT đều có chứa gen *bar* khi phân tích PCR. Tuy nhiên, đến thế hệ T2 gen *cryIAC* không xuất hiện ở đường chạy số 4 và 11 của hai dòng chuyển gen (hình 3.B3). Kết quả thể hiện rõ sự phân ly ở thế hệ T3 đối với cả hai gen *bar* và gen *cryIAC* (Hình 4.A4, 4.B4), điều đó chứng tỏ xảy ra phân ly tính trạng ở thế hệ sau. Điều này có thể giải thích rằng gen chuyển vào sẽ chèn vào hệ gen của cây ở các vị trí khác nhau trên nhiễm sắc thể (Stanton B. Gelvin, 2003). Sự phân ly tính trạng ở thế hệ sau có thể do gen chuyển vào ở trạng thái dị hợp tử, cây con ở trạng thái đồng hợp lặn sẽ không biểu hiện tính trạng. Mặt khác, nếu gen chuyển bị bất hoạt cũng sẽ không biểu hiện được tính trạng (Stanton B. Gelvin, 2003).



Hình 4. Kết quả kiểm tra gen *bar* và gen *cry1Ac* bằng PCR ở thế hệ T0 đến T3

Các nghiên cứu phân tích sự biểu hiện của gen *gus*, gen *bar* ở cây đậu tương chuyển gen đã được báo cáo. Kết quả của Clement *et al.* (2000) theo dõi sự biểu hiện của gen *gus* trên cây đậu tương từ thế hệ T₀ đến T₁, với tỷ lệ phân ly kiểu hình 3:1 hoặc 15:1, kết quả phân tích ở thế hệ T₁ với 81 dòng độc lập cho thấy 59% dòng theo tỷ lệ 3:1 và 11% theo tỷ lệ 15:1. Theo phân tích của Olhoft *et al.* (2003) trên đậu tương chuyển gen cho thấy gen *gus* có sự phân ly qua các thế hệ, cụ thể với 11 dòng T₀ đều có kết quả biểu hiện dương tính gen *gus*, đến thế hệ T₁ trong 77 dòng được đánh giá, có 8 dòng không có gen *gus* và 69 dòng có gen *gus* khi tiến hành lai Southern blot. Kết quả được ghi nhận với 4 dòng phân ly theo tỷ lệ 1:1, 29 dòng phân ly theo tỷ lệ 3:1, 39 dòng phân ly theo tỷ lệ 15:1, 5 dòng phân ly theo tỷ lệ khác. Tương tự, Xing A *et al.* (2000), tiến hành biến nạp gen *gus* và gen *bar* vào 15 dòng đậu tương ở thế hệ T₀, kết quả thu được 10 dòng biến nạp thành công, tiếp tục theo dõi ở T₁ cho thấy có sự phân ly của hai gen *bar* và gen *gus* trong quá trình hình thành nên thế hệ kế tiếp. Theo Trần Thị Cúc Hòa (2010) 164

dòng T₁ có sự phân ly đối với hai gen biến nạp *bar* và *soycry1Ac*, 68 dòng mang cả hai gen, 38 dòng mang gen *bar* và 12 dòng mang gen *soycry1Ac*. Tỷ lệ phân ly gen biến nạp ở thế hệ T₁ là 7,3%. Kết quả của chúng tôi cho thấy khả năng kháng thuốc diệt cỏ vẫn được duy trì 100% ở dòng VX93 – thế hệ T₁ (bảng 3 và hình 3A2, 3B2) đối với gen *bar* và gen *cry1Ac*. Tuy nhiên đến thế hệ T₂, T₃ đã có sự phân ly. Điều này cho thấy kết quả trên đã phản ánh sự di truyền của cây đậu tương chuyển gen cũng tuân theo quy luật phân ly của Mendel qua các thế hệ theo dõi.

4. KẾT LUẬN VÀ KIẾN NGHỊ

4.1. Kết luận

Đánh giá hiệu quả kháng thuốc diệt cỏ và kháng sâu cho thấy dòng đậu tương VX93 chuyển gen có khả năng kháng thuốc diệt cỏ và kháng sâu tốt, là cơ sở để phát triển thành giống chuyển gen.

4.2. Kiến nghị

Cần tiếp tục đánh giá và khảo nghiệm các dòng đậu tương có triển vọng trên đồng ruộng để chọn lọc

và bồi dưỡng thành các giống đậu tương chuyển gen.

Lời cảm ơn: Để đạt được những kết quả trong bài báo này, chúng tôi xin chân thành cảm ơn sự hợp tác và giúp đỡ từ Bộ Khoa học và Công nghệ Việt Nam và Trường Đại học Đông Á, Hàn Quốc.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn. Quy chuẩn kỹ thuật quốc gia về “*Khảo nghiệm giá trị canh tác và sử dụng của giống đậu tương*” QCVN 01-58: 2011/ Bộ NN&PTNT.

2. Clemente T. E, La Vallee B. J, Howe A. R., Conner – Ward D., Rozman R. J., Hunter P. E., Broyles D. L., Kasten D. S., Hinchee M. A. (2000). Progeny analysis of glyphosate selected transgenic soybeans derived from *Agrobacterium* – mediated transformation. *Crop Sci.* 40: 797 – 803.

3. Jerry S. and Green M. (2009). Evolution of glyphosate-resistant crop technology. *Weed Science* 57:108–117.

4. Margie M. Paz, Huixia Shou, Zibiao Guo, Zhanyuan Zhang, Anjan K. Banerjee, Kan Wang (2004). Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant. *Euphytica* 136: 167–179, 2004.

5. Margine M. Paz, Juan Carlos Martinez, Kalvig A. B., Fonger T. M., Kan Wang (2005). Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation. *Plant Cell Rep.* 206-213.

6. Ngô Thế Dân, Trần Đình Long, Trần Văn Lai, Đỗ Thị Dung, Phạm Thị Dao (1999). *Cây đậu tương*. Nxb Nông nghiệp Hà Nội.

7. Nguyễn Tiến Dũng, Nguyễn Văn Đồng, Ngô Xuân Bình (2010). Đánh giá khả năng tái sinh chồi ở một số giống đậu tương (*Glycine max* (L.) Merrill) của Việt Nam bằng phương pháp nuôi cấy nốt lá mầm phục vụ nghiên cứu chuyển gen. *Tạp chí Hoạt động khoa học*. Bộ Khoa học và Công nghệ, số 11 (618) (38-40).

8. Nguyễn Tiến Dũng, Nguyễn Thị Tình, Bùi Trí Thức, Ngô Xuân Bình (2011). Nghiên cứu khả năng tiếp nhận gen của một số giống đậu tương (*Glycine max* (L.) Meril) của Việt Nam thông qua vi khuẩn

Agrobacterium tumefaciens. Kỷ yếu hội thảo khoa học công nghệ tuổi trẻ các trường đại học và cao đẳng khối nông – lâm – ngư – thủy toàn quốc lần thứ V năm 2011, trang 338- 343.

9. Nguyễn Văn Đồng, Nguyễn Anh Vũ, Nguyễn Hữu Kiên, Dương Tuấn Bảo (2013). Nghiên cứu biến nạp gen liên quan đến khả năng kháng hạn và kháng thuốc trừ cỏ vào giống đậu tương ĐT22. *Tạp chí NN&PTNT* 6: 3 – 9.

10. Nguyễn Anh Vũ, Lương Thanh Quang, Nguyễn Hữu Kiên, Bùi Thúy Hiền, Dương Tuấn Bảo, Nguyễn Minh Ngọc, Nguyễn Trung Anh, Đỗ Như Quỳnh, Trần Quốc Bảo, Vũ Hoàng Nam, Trần Thu Cúc, Phạm Thị Lý Thu, Lê Huy Hàm, Nguyễn Văn Đồng (2013). Phân lập và thiết kế vector phục vụ công tác chọn tạo giống cây trồng biến đổi gen có khả năng chống chịu với điều kiện bất thuận. Hội thảo quốc gia về khoa học cây trồng lần thứ nhất, trang 258 – 265.

11. Olhoft P. M., Lin K., Galbraith J., Nielsen N. C., Somers D. A. (2001). The role of thiol compounds in increasing *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean cotyledonary-node cells. *Plant Cell Rep.* (2001) 20:731–737.

12. Olhoft P. M., Flagel L. E., Donovan C. M., Somers D. A. (2003). Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary – node method. *Original Article*, 216: 723 – 735.

13. Trần Thị Cúc Hòa (2008). Hiệu quả tạo dòng đậu tương biến đổi gen từ giống MTĐ176, HL202, Maverik, Williams82 bằng phương pháp nốt lá mầm qua trung gian *Agrobacterium tumefaciens*. *Tạp chí NN&PTNT* 1: 14 – 19.

14. Trần Thị Cúc Hòa, 2010. Tạo chọn giống đậu tương kháng sâu ở Việt Nam. Kết quả nghiên cứu khoa học công nghệ 206 – 2010. Viện Khoa học Nông nghiệp Việt Nam, 214 – 220.

15. Saghai-Marooof M. A., Soliman K. M., Jorgensen R. A. and Allard R. W. (1984). Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 81, pp. 8014-8018.

16. Stanton B. Gelvin (2003). *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation: the Biology behind

the "Gene-Jockeying" Tool. Microbiology and Molecular Biology Reviews, V.67, p 16-37.

17. Xing A., Zhang Z., Sato S., Staswick P. and Clemente T. (2000). Use of the Two T - DNA Binary System to Derive Marker - Free Transgenic Soybeans. *In vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 36:456 - 463.

18. Walker D. R., All J. N., Mc Phenson R. M., Boerma H. R. and Parrot W. A. (2000). Field evaluation of soybean engineered with a synthetic *cry1Ac* transgene for resistance to corn earworm, soybean looper and velvetbean caterpillar (*Lepidoptera*: Noctuidae) and lesser cornstalk borer (*Lepidoptera*: Pyralidae). *J. Econ Entomol.* 93: 613 - 622.

ASSESSMENT OF THE POSSIBILITY HERBICIDE TOLERANCE AND INSECT TOLERANCE OF TRANSGENIC SOYBEAN LINES

La Van Hien¹, Nguyen Tien Dung¹, Ngo Xuan Binh¹

¹*Faculty of Biotechnology and Food Technology, TUAF*

Summary

Evaluation of transgenic efficiency was conducted from T0 to T3 generations are grown in greenhouse and in the field. The herbicide resistance based on inspection methods of PPT and herbicide of Basta 0.3 percent. Resistant to pests conducted follow-up on the field and artificial infection in the laboratory. The results assessed twenty-five T0 plants showed that its have been thirteen T0 plants tolerated with PPT chemical, concentration from 0.3 to 1.0 mg per mL. Generation T1, T2 and T3 were sprayed after 3-5 days tested basta 0.3 percent have been rate of herbicide resistant plants as 92.8, 91.3 and 82.2 percent, respectively. To insect resistance was fluctuated in the transgenic soybean lines and compared with control through different season crop. T1 generation without leafroller appears, bollworm accounting 3.74 percent. T2 and T3 generation rate leaf roller plants averaged 2.45 percent and 5.10 percent, the rate of bollworm plants averaged 3.56 percent and 4.62 percent, respectively. The results showed that PCR with herbicide resistance (*bar* gene) with size 408 bp in T0 to T3 generation and size 504 bp of *cry1Ac* gene of T0, T1, T2 and T3 generation tested.

Keyword: *Bar, cry1Ac, transgenic, soybean, insect resistance.*

Người phản biện: PGS.TS. Nguyễn Văn Đồng

Ngày nhận bài: 21/3/2016

Ngày thông qua phản biện: 21/4/2016

Ngày duyệt đăng: 28/4/2016