

DOI:10.22144/jvn.2017.017

CÁC NHÂN TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN HIỆU QUẢ CHUYỂN GEN QUA VI KHUẨN *Agrobacterium* Ở LÚA (*Oryza sativa* L.) SỬ DỤNG HỆ THỐNG CHỌN LỌC PHOSPHOMANNOSE-ISOMERASE

Trần Thị Xuân Mai và Nguyễn Thị Liên

Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 09/11/2016

Ngày chấp nhận: 29/04/2017

Title:

Factors affecting the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation in rice (*Oryza sativa* L.) using phosphomannose isomerase selection system

Từ khóa:

Agrobacterium tumefaciens, Chọn lọc tích cực, Chuyển gen, Giống lúa Taipei 309, Phosphomannose-isomerase

Keywords:

Agrobacterium tumefaciens, phosphomannose-isomerase, positive selection, Taipei 309, transformation

ABSTRACT

*In this study, several factors including callus treatment, light regimes during co-cultivation period and using mannose as the selective agent in regeneration medium were investigated for the transformation in japonica rice variety Taipei 309. Proliferated calli derived from the embryo scutella were inoculated with *Agrobacterium tumefaciens* carrying the vector containing a gene encoding phosphomannose isomerase (PMI). Only transformed cells were capable of utilizing mannose as a carbon source and callus induction frequency on selection medium RO5 was used to evaluate the gene transfer efficiency. The results indicated that the increase of gene transfer efficiency in wounded calli (7.3%) as compared to intact calli (3.7%). In co-cultivation period, the best result was obtained (9.3%) when callus was cocultured under continuous light regime. Shoot regeneration from transformed calli was 100% and 15.6% in medium RO6 and medium RO6 + 2% mannose, respectively. Similarity, the shoot proliferation rate was 97.8% and 11.1% in medium RO7 and medium RO7 + 1.5% mannose, respectively. A chlorophenol red (CPR) assay was used to confirm the activity of PMI gene, 100% of putative transgenic rice plants gave positive result. The presence of PMI gene was also evaluated by Polymerase Chain Reaction (PCR) analysis, the expected 600bp fragment for the PMI gene was amplified from these putative transgenic rice plants.*

TÓM TẮT

*Trong nghiên cứu này, các yếu tố bao gồm xử lý mô sẹo, chế độ ánh sáng trong thời gian đồng nuôi cấy và sử dụng mannose như là tác nhân chọn lọc trong môi trường tái sinh được khảo sát về sự chuyển gen ở giống lúa Taipei 309. Các mô sẹo từ phôi được chủng với *Agrobacterium tumefaciens* mang vector chứa gen mã hóa enzyme phosphomannose isomerase (PMI). Chỉ những tế bào được chuyển gen mới có thể sử dụng mannose như nguồn carbon và tần số mô sẹo hình thành trên môi trường chọn lọc RO5 được sử dụng để đánh giá hiệu quả chuyển gen. Kết quả cho thấy có sự gia tăng hiệu quả chuyển gen ở mô sẹo bị tổn thương (7,3%) so với mô sẹo còn nguyên vẹn (3,7%). Mô sẹo được đồng nuôi cấy dưới chế độ sáng liên tục cho kết quả tốt nhất, hiệu quả đạt 9,3%. Sự hình thành chồi của các mô sẹo đã chuyển gen đạt 100% trên môi trường RO6 và 15,6% trên môi trường RO6 + 2% mannose. Tương tự có 97,8% chồi đã phát triển trên môi trường RO7 và 11,1% chồi phát triển trên môi trường RO7 + 1,5% mannose. Thử nghiệm chlorophenol đỏ đã xác nhận 100% dòng lúa được cho là chuyển gen có sự hoạt động của gen PMI. Phân tích PCR cũng cho thấy một đoạn DNA 600bp ở gen PMI được khuếch đại từ các dòng lúa này.*

Trích dẫn: Trần Thị Xuân Mai và Nguyễn Thị Liên, 2017. Các nhân tố ảnh hưởng đến hiệu quả chuyển gen qua vi khuẩn *Agrobacterium* ở lúa (*Oryza sativa* L.) sử dụng hệ thống chọn lọc phosphomannose-isomerase. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 49b: 9-17.

1 GIỚI THIỆU

Cây lúa (*Oryza sativa* L.) không chỉ là nguồn lương thực chủ yếu của con người mà còn là cây mô hình của nhóm cây một lá mầm để phục vụ cho các nghiên cứu về chức năng của gen, đột biến gen và chuyển nạp gen. Cây lúa chuyển gen đầu tiên được công bố vào năm 1988 bằng phương pháp điện biến nạp (Toriyama *et al.*, 1988), tiếp theo là thể hệ lúa chuyển gen được tạo ra bằng súng bắn gen (Christou, 1991) và chuyển gen qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* (Hiei *et al.*, 1994). Dựa trên các công trình nghiên cứu đã công bố cho thấy rằng phương pháp chuyển gen bằng vi khuẩn *Agrobacterium* là phương pháp được sử dụng phổ biến nhất cho đến nay. Để có thể phát triển một quá trình chuyển gen hiệu quả và đáng tin cậy, sử dụng gen chọn lọc kèm theo là điều kiện tiên quyết và đặc biệt hữu ích giúp quá trình chọn lọc thành công. Theo nhiều báo cáo cho thấy các gen chọn lọc trước đây thường được sử dụng là các gen kháng kháng sinh hoặc kháng thuốc diệt cỏ (Ayres and Park 1994; Hiei *et al.*, 1997). Tuy nhiên, sử dụng các gen chọn lọc này có nhiều hạn chế vì hiệu quả tái sinh rất thấp do môi trường chọn lọc chứa các hợp chất gây độc (Potrykus and Spangenberg, 1995), thêm vào đó các loại gen chọn lọc này thường không được sự chấp nhận của cộng đồng dẫn đến khó khăn trong thương mại hoá sản phẩm. Vì thế, việc tạo ra cây trồng chuyển gen, tránh sử dụng độc chất và gen tương ứng, được xem như một phương pháp được nhiều mong đợi (Daniell, 1999). Gen PMI từ vi khuẩn *Escherichia coli* (*E. coli*) mã hoá enzyme phosphomannose isomerase (PMI) xúc tác phản ứng chuyển hoá mannose-6-phosphate thành fructose-6-phosphate. Các tế bào thực vật thiếu enzyme này không thể sống sót trên môi trường sử dụng mannose là nguồn carbon duy nhất. Trong hệ thống chọn lọc PMI/mannose, chỉ các tế bào đã được chuyển gen thành công, nguồn vật liệu di truyền được biến đổi làm biểu hiện gen *manA* của *E. coli* mới có thể sử dụng mannose và phát triển. Trong khi đó, ở các tế bào không xảy ra biến nạp, sự phát triển hầu như không đáng kể khi vắng mặt nguồn năng lượng thích hợp (Reed *et al.*, 2001). Gen PMI, còn được gọi là gen chọn lọc “tích cực”, và an toàn sinh học nên được sử dụng rộng rãi và đã được ứng dụng thành công trong các nghiên cứu biến nạp trên rất nhiều loài như thực vật một lá mầm và hai lá mầm. Chuyển nạp gen vào thực vật thường bị ảnh hưởng bởi rất nhiều nhân tố do quá trình chuyển gen phải trải qua rất nhiều giai đoạn, trong đó giai đoạn lây nhiễm, giai đoạn đồng nuôi cấy và môi trường chọn lọc có ảnh hưởng rất lớn đến hiệu quả chuyển gen. Do đó, mục tiêu của nghiên cứu này nhằm tìm ra quy trình

chuyển gen hiệu quả trên giống lúa japonica Taipei 309, từ đó có thể ứng dụng chuyển gen cho các giống lúa indica thường trồng phổ biến ở vùng Đồng bằng sông Cửu Long.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Vật liệu

Giống lúa được sử dụng để chuyển gen là giống Taipei 309 thuộc giống lúa Japonica, do phòng Công nghệ sinh học, Viện lúa Đồng bằng sông Cửu Long cung cấp. Vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*) được sử dụng thuộc dòng LBA4404 do phòng Công nghệ gen thực vật, Viện Nghiên cứu và Phát triển Công nghệ sinh học, trường Đại học Cần Thơ cung cấp. Vector được sử dụng là một vector nhị thể pCAMBIA 1380-PMI (Viện lúa Đồng bằng sông Cửu Long cung cấp) có chứa gen PMI của vi khuẩn *E. coli* là gen mã hóa cho enzyme phosphomannose isomerase được điều khiển bởi vùng khởi động CaMV35S có nguồn gốc từ virus gây bệnh khảm ở súp-lơ.

2.2 Phương pháp xử lý tạo mô sẹo

Chọn những hạt lúa chắc còn nguyên vẹn mới thu hoạch hoặc có thời gian sau thu hoạch không quá 2 tháng, sau đó tiến hành bóc vỏ lúa sao cho không làm tổn thương phần phôi của hạt lúa. Những hạt gạo có phần phôi nhũ trắng, không có những đốm đen do nấm và phần phôi còn nguyên vẹn được chọn để khử trùng bằng cách cho các hạt gạo này vào một bình tam giác (đã được khử trùng), còn 70° được thêm vào bình tam giác sao cho vừa ngập các hạt gạo, lắc đều bằng tay trong 30 - 60 giây. Đổ bỏ còn, sau đó cho dung dịch nước Javel có chứa 5% sodium hypochloride vào ngập hạt gạo, nhỏ 1-2 giọt Tween 20, đặt lên máy khuấy từ và lắc ở tốc độ 50 vòng/phút trong 25 phút, rửa hạt từ 7-10 lần bằng nước cất đã được khử trùng (thao tác rửa cần thực hiện trong tủ cấy vô trùng). Hạt gạo sau đó được cho vào một đĩa petri có lót giấy thấm đã được khử trùng để thấm khô hạt gạo khoảng 10-15 phút, dùng kẹp cây lần lượt chuyển các hạt gạo lên môi trường tạo mô sẹo RO0 có thành phần căn bản là muối N6 (Chu, 1978) gồm muối N6 (Duchefa) 4 g/L; Gamborg B5 vitamin 112 mg/L; proline 2,878 g/L; casein hydrolysate (CEH) 300 mg/L; sucrose 30 g/L; 2,4-D 3 mg/L; phytigel 4 g/L; pH 5,8. Tiến hành nuôi cấy trong điều kiện chiếu sáng liên tục ở nhiệt độ 32°C trong 5 ngày.

2.3 Chuẩn bị vi khuẩn

Vi khuẩn *A. tumefaciens* dòng LB4404 chứa plasmid pCAMBIA1380-PMI được cất giữ trong glycerol ở -80°C được cấy trên đĩa petri chứa môi trường YEB (5 g/L beef extract; 1 g/L yeast

extract; 5 g/L peptone; 5 g/L sucrose; 0,5 g/L MgSO₄.7H₂O; 15 g/L agar; pH 7,2 có bổ sung 50 mg/L rifampicin và 50mg/L kanamicin) nuôi cấy trong 3 ngày ở 28°C. Chuyển vi khuẩn *A. tumefaciens* từ đĩa nuôi cấy (lấy đầy một loop kim cấy) vào tube 50 mL đã khử trùng có chứa 40 mL môi trường lây nhiễm RO1 bao gồm: muối N6 (Duchefa) 4 g/L; Gamborg B5 vitamin 112 mg/L; CEH 300 mg/L; sucrose 68,5 g/L; glucose 36 g/L; pH 5,2; acetosyringone 100 µM được lọc bằng filter và thêm vào sau khi môi trường đã khử trùng. Nuôi vi khuẩn trên máy lắc ở 150 vòng/phút, 28°C trong 1 giờ. Điều chỉnh dịch huyền phù vi khuẩn về OD₆₀₀ từ 0,05-0,1.

2.4 Xử lý mô sẹo trong giai đoạn lây nhiễm vi khuẩn

Chọn các mô sẹo 5 ngày tuổi phát triển từ phôi, mô sẹo có chất lượng tốt là mô no tròn, có màu trắng đục hơi ngả vàng, cho vào chai thủy tinh vô trùng, cho dung dịch vi khuẩn RO1 vào chai thủy tinh sao cho dung dịch ngập đầy mô sẹo, ngâm trong 2 phút. Trong thời gian ngâm mô, nhân tố xử lý tạo vết thương mô sẹo (bằng cách dùng đầu nhọn của mũi dao mổ châm nhẹ 3-4 vị trí khác nhau xung quanh mô) được theo dõi. Thí nghiệm được bố trí với hai nghiệm thức, nghiệm thức 1 gồm các mô sẹo không gây tổn thương mô và nghiệm thức 2 gồm các mô sẹo đã xử lý tạo vết thương, thực hiện với 100 mô sẹo cho một nghiệm thức, mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Hiệu quả chuyển gen được đánh giá dựa trên phần trăm mô sẹo phát triển tốt trên môi trường chọn lọc RO5.

2.5 Đồng nuôi cấy

Sau giai đoạn lây nhiễm, đổ bỏ dung dịch vi khuẩn RO1. Mô sẹo được làm khô trên giấy thấm vô trùng 20-30 phút để loại bớt vi khuẩn dư thừa và sau đó cấy lên môi trường đồng nuôi cấy RO2 bao gồm: muối N6 (Duchefa) 4 g/L; Gamborg B5 vitamin 112 mg/L; CEH 300 mg/L; sucrose 30 g/L; glucose 10 g/L; 2,4-D 3 mg/L; phytigel 4g/L; pH 5,2; acetosyringone 100 µM. Trước khi chuyển mô sẹo vào môi trường RO2, các đĩa môi trường RO2 đã được phủ một lớp giấy thấm Whatman (giấy thấm đã khử trùng và được thấm ướt với 0,5 mL dung dịch môi trường RO1), đồng nuôi cấy ở 25°C trong 3 ngày. Trong giai đoạn này, nhân tố chiếu sáng được theo dõi, thí nghiệm được bố trí với hai nghiệm thức, nghiệm thức 1 gồm các mô sẹo được ủ trong điều kiện tối liên tục và nghiệm thức 2 gồm các mô sẹo được ủ trong điều kiện sáng liên tục, thực hiện với 100 mô sẹo cho một nghiệm thức, mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần. Hiệu quả chuyển gen được đánh giá dựa trên phần trăm mô sẹo phát triển tốt trên môi trường chọn lọc RO5.

2.6 Chọn lọc mô sẹo chuyển gen

Sau 3 ngày đồng nuôi cấy, mô sẹo được rửa với nước cất khử trùng 4-6 lần, lần rửa sau cùng thêm vào nước cất 300 mg/L carbenicillin (bước rửa này có thể bỏ qua nếu như không nhìn thấy vi khuẩn *A. tumefaciens* phát triển trên các mô sẹo), làm khô mô sẹo và loại bỏ phần hạt gạo còn dính với mô sẹo, chuyển mô sẹo sang môi trường phục hồi RO0 nhưng có bổ sung 300mg/L carbenicillin (được lọc bằng filter và thêm vào sau khi môi trường đã khử trùng), nuôi cấy trong 1 tuần nhằm giúp cho mô có thể phục hồi lại sau giai đoạn lây nhiễm cũng như chuẩn bị cho giai đoạn chọn lọc. Sau đó các mô sẹo được chuyển sang môi trường chọn lọc lần 1 (RO3) bao gồm: Muối N6 (Duchefa) 4 g/L; Gamborg B5 vitamin 112 mg/L; proline 2,878 g/L; CEH 300 mg/L; sucrose 30 g/L; mannose 30 g/L; 2,4-D 3 mg/L; agarose type I 7g/L; pH 5,8; bổ sung 300mg/L carbenicillin, nuôi cấy trong 2 tuần, tiếp theo là 2 tuần trên môi trường chọn lọc lần 2 (RO4) có các thành phần căn bản giống môi trường RO3 nhưng giảm nồng độ sucrose xuống còn 15 g/L, sau cùng là lần chọn lọc 3 (RO5) với thành phần căn bản như môi trường RO3 nhưng tăng nồng độ mannose lên 40 g/L và không bổ sung sucrose, tiếp tục nuôi cấy mô sẹo trong 2 tuần. Trong giai đoạn chọn lọc mô sẹo chuyển gen, mỗi đĩa đặt 8-12 mô sẹo, tất cả mô sẹo đều được nuôi cấy ở điều kiện sáng liên tục, 32°C. Theo dõi và chọn lọc các mô sẹo có dấu hiệu phát triển (mô có màu vàng sáng, phát sinh những khối mô sẹo mới).

2.7 Ảnh hưởng của đường mannose đến khả năng tạo chồi cây chuyển gen

2.7.1 Ảnh hưởng của đường mannose trên môi trường tiền tạo chồi

Những mô sẹo phát triển tốt trên môi trường chọn lọc RO5 được chuyển sang môi trường tiền tạo chồi RO6 có các thành phần: N6 (Duchefa) 4 g/L; Gamborg B5 vitamin 112 mg/L; proline 500 mg/L; CEH 300 mg/L; sucrose 30 g/L; Kn 2,0 mg/L; NAA 1,0 mg/L; ABA 5 mg/L; agarose type I 7 g/L; pH 5,8; thêm 300 mg/L carbenicillin. Sự bổ sung mannose vào môi trường tiền tạo chồi nhằm đánh giá ảnh hưởng của đường mannose đến hiệu quả tái sinh, thí nghiệm được bố trí với hai nghiệm thức, nghiệm thức 1 gồm các mô sẹo được nuôi cấy trên môi trường tiền tạo chồi RO6 không bổ sung mannose và nghiệm thức 2 gồm các mô sẹo được nuôi cấy trên môi trường tiền tạo chồi RO6 bổ sung 2% mannose, thực hiện với 30 mô sẹo cho một nghiệm thức, mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần, mỗi đĩa đặt 4-6 mô sẹo. Các mô sẹo được nuôi cấy trong 1 tuần, ở điều kiện sáng liên tục, 32°C.

2.7.2 Ảnh hưởng của đường mannose trên môi trường tạo chồi

Sau khi nuôi cấy trên môi trường tiền tạo chồi, các mô sẹo được chuyển sang môi trường tạo chồi RO7, khác biệt với các môi trường trước đó đều sử dụng môi trường muối N6, môi trường tạo chồi chủ yếu sử dụng muối MS (Murashige và Skoog, 1962), thành phần gồm muối MS có vitamin (Duchefa) 4,4 g/L; CEH 2 g/L; Kn 2,0 mg/L; NAA 0,02 mg/L; sucrose 30 g/L; sorbitol 30 g/L; agarose type I 10g/L; pH 5,8; thêm 300 mg/L carbenicillin, có bổ sung hoặc không bổ sung 1,5% mannose. Thí nghiệm được bố trí với hai nghiệm thức, nghiệm thức 1 gồm các mô sẹo được nuôi cấy trên môi trường tiền tạo chồi RO7 không bổ sung mannose và nghiệm thức 2 gồm các mô sẹo được nuôi cấy trên môi trường tiền tạo chồi RO7 bổ sung 1,5% mannose, thực hiện với 15 mô sẹo cho một nghiệm thức, mỗi nghiệm thức được lặp lại 3 lần, mỗi đĩa đặt 4-6 mô sẹo. Các mô sẹo được nuôi cấy ở điều kiện sáng liên tục, 32°C. Sau 1 tuần, quan sát dưới kính soi nổi và ghi nhận các chồi đã hình thành.

Sau 1 tuần nuôi cấy tiếp tục chuyển những mô phát triển sang môi trường RO8 (RO8 có thành phần giống với môi trường RO7 nhưng agarose type I hạ xuống còn 7 g/L và hoàn toàn không có mannose) mô được nuôi cấy trong 2 tuần, ở điều kiện sáng liên tục, 32°C.

Khi chồi phát triển khoảng 2-3 cm thì chuyển mô sang các bình tam giác 250 mL chứa môi trường tạo rễ RO9 (4,4 g/L MS có vitamin (Duchefa); 30 g/L sucrose; 4 g/L phytagel; pH 5,8), các mô được nuôi cấy ở điều kiện 16 giờ sáng, 8 giờ trong tối, ở nhiệt độ 28°C trong 2 tuần.

2.8 Đưa cây ra trồng ở điều kiện nhà lưới

Khi cây đã có bộ rễ vững chắc và cao khoảng 10 đến 15 cm, lấy cây ra khỏi bình tam giác, rửa sạch agar bám vào rễ. Đặt cây vào chậu đất được làm ẩm bằng môi trường dinh dưỡng Yoshida (Yoshida *et al.*, 1976). Để giảm bớt ảnh hưởng của sự chênh lệch nhiệt độ và cường độ chiếu sáng, dùng bọc plastic có đục lỗ xung quanh bọc để phủ lên trên chậu cây, trồng ở điều kiện nhà lưới. Sau 1 tuần, khi cây đã có thể thích nghi với môi trường tự nhiên thì bỏ bọc plastic. Tiếp tục chăm sóc, bón phân để cây phát triển đến khi thu hoạch hạt T1.

2.9 Xác định cây chuyển gen bằng phương pháp Chlorophenol đỏ

Phương pháp Chlorophenol đỏ (Chlorophenol red-CPR) được sử dụng để nhận diện cây chuyển gen (Lucca *et al.*, 2001). Các cây đang ra rễ trong môi trường RO9 trước khi được chuyển sang trồng ở điều kiện nhà lưới sẽ được sử dụng để phân tích

CPR. Thử nghiệm được thực hiện trên đĩa nhựa hình chữ nhật (86 mm x 128 mm) chứa 96 giếng, cắt lấy một đoạn rễ khoảng 1 cm ở các cây được cho là chuyển gen và cây không chuyển gen, đặt vào các giếng riêng biệt, ngâm rễ với môi trường MS1 (4,4 g/L MS có vitamin (Duchefa); 2% mannose; pH 5,8) trong 60 phút. Sau đó loại bỏ môi trường MS1 ra khỏi giếng và thêm 500 µL môi trường MS2 (4,4 g/L MS có vitamin (Duchefa); 2% mannose; 0,5% sucrose; 2 mg/mL chlorophenol đỏ; pH 6,0). Tại pH này dung dịch chlorophenol có màu đỏ rất sậm. Đậy nắp hộp đĩa và quấn lại bằng parafilm, mẫu được ủ trong điều kiện chiếu sáng ở 32°C trong 3-4 ngày. Sự biến đổi màu (từ đỏ sang vàng) của các mẫu sẽ được đánh giá.

2.10 Xác định cây chuyển gen bằng phân tích PCR

Lá non của các dòng lúa được cho là chuyển gen từ các cây lúa T0 được ly trích DNA theo quy trình của Dellaporta *et al.* (1983). Phản ứng PCR được thực hiện với cặp mồi chuyên biệt dựa trên trình tự gen PMI, trình tự mồi xuôi 5' GGAGATATCGTTTCACTGCG 3' và mồi ngược 5' TTTCAGCGAACAGGAACATC 3'. Các thành phần của phản ứng PCR như sau: 2,5 µL buffer 10X (750 mM Tris HCl (pH 8,8); 100 mM (NH₄)₂SO₄; 1% Triton X-100; 5% DMSO); 1,5 mM MgCl₂; 200 µM dNTP mỗi loại, 200 nM mỗi loại mồi, 1,25 unit *Taq* polymerase và 50-100 ng DNA, thêm nước cất vô trùng cho đủ thể tích 25 µL. Phản ứng khuếch đại được tiến hành ở 95°C trong 5 phút, sau đó lặp lại 35 chu kỳ với các bước như sau: biến tính ở 95°C trong 30 giây, bắt cặp mồi vào khuôn ở 55°C trong 30 giây, kéo dài ở 72°C trong 1 phút. Cuối cùng phản ứng được duy trì ở 72°C trong 10 phút. Sản phẩm PCR khuếch đại một đoạn DNA có kích thước 600 bp được phân tích bằng điện di trên gel 1,5% agarose trong dung dịch đệm TBE 1X.

2.11 Phân tích thống kê

Tất cả các số liệu đã thu thập được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel 2016 và được thống kê bằng phần mềm SPSS version 23.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Ảnh hưởng của việc tạo vết thương trên mô đến tần số biến nạp gen

Trong tự nhiên, vi khuẩn *A. tumefaciens* xâm nhiễm được vào tế bào thực vật ở những vị trí mô thực vật bị tổn thương. Dựa vào đặc điểm này, thí nghiệm được thực hiện với các mô sẹo 5 ngày tuổi có xử lý hoặc không xử lý tạo vết thương trong giai đoạn lây nhiễm vi khuẩn *A. tumefaciens*, các mô

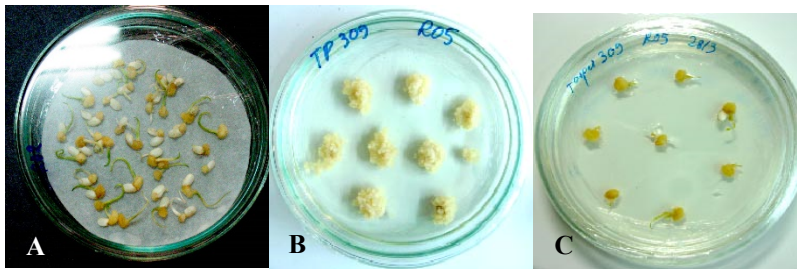
seọ sau đó được đồng nuôi cấy 3 ngày trong điều kiện tối ở 25°C. Để đánh giá ảnh hưởng của việc tạo vết thương trên mô đến tần số biến nạp gen, các mô seọ sau khi đồng nuôi cấy 3 ngày được chuyển sang nuôi cấy trên môi trường chọn lọc. Tần số biến nạp gen được xác định bằng phần trăm số mô seọ tiếp tục phát triển (tăng kích thước mô seọ) trên môi trường chọn lọc RO5 (Hình 1). Kết quả từ Bảng 1 cho thấy trong 100 mô seọ không xử lý gây tổn thương có 3,7% mô đã phát triển tốt trên môi trường chọn lọc RO5, trong khi đó mô seọ ở nghiệm thức có xử lý gây tổn thương đạt hiệu quả 7,3%. Kết quả thí nghiệm đã chứng tỏ việc xử lý tạo vết thương trên mô có ảnh hưởng tích cực đến hiệu quả chuyển gen.

Bảng 1: Ảnh hưởng của xử lý mô seọ trong giai đoạn lây nhiễm đến khả năng tạo mô seọ

Nghiệm thức	Số mô lây nhiễm	Phần trăm mô phát triển trên môi trường RO5 (%)
Cắt	100	7,3a
Không cắt	100	3,7b

Ghi chú: Giá trị trong cùng một cột theo sau bởi các chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$)

Việc xử lý tạo vết thương là rất quan trọng cho sự biến nạp gen hiệu quả và đã được áp dụng thành công để nâng cao hiệu quả biến nạp gen trong nhiều loài thực vật. Có nhiều kiểu xử lý gây tổn thương mô trong các nghiên cứu chuyển gen như tạo các vết cắt nhỏ bằng dao mổ, tạo những vết thương cực nhỏ bằng những hạt vi đạn, bằng sóng siêu âm sonication hay bằng kim tiêm



Hình 1: Mô seọ đồng nuôi cấy trên môi trường RO₂ (A); Mô seọ phát triển trên môi trường chọn lọc (B); Mô seọ không phát triển trên môi trường chọn lọc (C)

Đã có nhiều thí nghiệm chứng tỏ ánh sáng có tác dụng thúc đẩy quá trình sự chuyển gen từ *A. tumefaciens* sang tế bào ở một số loài thực vật. Theo báo cáo của De Clercq *et al.* (2002) ánh sáng thúc đẩy sự chuyển gen từ *A. tumefaciens* vào tế bào thực vật và đồng nuôi cấy trong điều kiện tối đã gây hại cho mô cây họ đậu *Phaseolus acutifloius*. Escudero and Hohn (1997) đã báo cáo rằng sự vận chuyển T-DNA vào hạt đang nảy mầm của cây thuốc lá đã bị ức chế khi hạt mầm thuốc lá

(Sreeramanan *et al.*, 2006). Trong giai đoạn xử lý tổn thương bởi sóng siêu âm sonication đã tạo ra nhiều vết tổn thương rất nhỏ trên tế bào thực vật, các vết thương này rất sâu và cục bộ không hề làm tổn thương các tế bào vùng lân cận. Ahsan *et al.* (2007) đã báo cáo rằng việc tạo ra vết thương bằng cách dùng kim mũi nhọn rạch một vết cắt ở chính giữa mẫu lá mầm cà chua đã tăng tần suất chuyển nạp gen hơn là cắt đôi lá mầm. Nghiên cứu cũng cho thấy việc xử lý tạo vết thương trên mô seọ đã cải thiện được sự chuyển nạp gen của vi khuẩn *A. tumefaciens*.

3.2 Ảnh hưởng của ánh sáng ở giai đoạn đồng nuôi cấy đến tần số biến nạp gen

Ánh sáng được xem là một trong những nhân tố quan trọng tác động mạnh đến sự chuyển T-DNA từ *A. tumefaciens* đến tế bào của một số loại thực vật. Kết quả Bảng 2 cho thấy các mô seọ sau khi được xử lý tạo vết thương và lây nhiễm với vi khuẩn, được đồng nuôi cấy trong điều kiện sáng liên tục có số mô phát triển tiếp tục trên môi trường RO5 là 9,3%, cao hơn so với đồng nuôi cấy trong điều kiện tối liên tục (7,3%).

Bảng 2: Ảnh hưởng của ánh sáng trong giai đoạn đồng nuôi cấy đến khả năng tạo mô seọ

Nghiệm thức	Số mô sử dụng	Phần trăm mô phát triển trên môi trường RO5 (%)
Sáng	100	9.3a
Tối	100	7.3b

Ghi chú: Giá trị trong cùng một cột theo sau bởi các chữ cái khác nhau thì khác biệt có ý nghĩa ($p < 0,05$)

được phun với *A. tumefaciens* và được ủ trong tối. Ánh sáng có thể đã thúc đẩy sự chuyển T-DNA từ *A. tumefaciens* vào tế bào thực vật thông qua ảnh hưởng đến những yếu tố sinh lý bao gồm mức độ hormone thực vật, sự sinh sôi phát triển của tế bào thực vật và giai đoạn trong chu kỳ sinh trưởng của tế bào (De Kathen and Jacobsen, 1995; Villemont *et al.*, 1997). Các kết quả nghiên cứu của Zambre *et al.* (2003) đã cho thấy ánh sáng trong giai đoạn đồng nuôi cấy có tác động tích cực đến hiệu quả

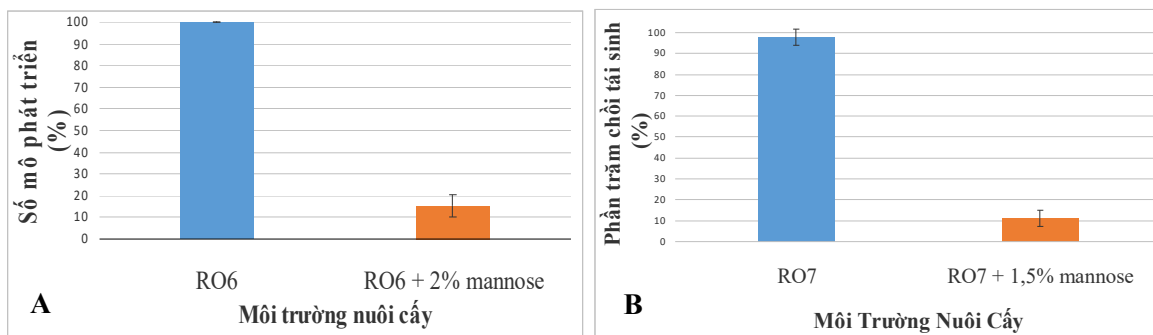
chuyển gen qua vi khuẩn *A. tumefaciens* ở cây *Arabidopsis thaliana* và cây đậu *Phaseolus acutifolius*.

Nhiều quy trình chuyển gen qua vi khuẩn *A. tumefaciens* trên các loài cây trồng đều áp dụng giai đoạn đồng nuôi cây mô sẹo ở điều kiện tối mà hầu hết là do đặc tính của các mô sẹo ở các loài thực vật này nhạy cảm với ánh sáng hoặc tiết ra nhiều hợp chất phenol ức chế sự phát triển mô sẹo trong điều kiện sáng. Tương tự như vậy, phần lớn các báo cáo về quy trình chuyển gen ở lúa đều nuôi cấy mô sẹo trong điều kiện ảm tối, do đó khi đến giai đoạn đồng nuôi cấy mô sẹo cũng sử dụng cùng điều kiện ảm tối là điều tất nhiên (Hervé and Kayano, 2006; Hu *et al.*, 2016). Tuy nhiên, trong nghiên cứu này, các mô sẹo của giống lúa Taipei 309 đều phát triển tốt trên các môi trường tạo mô sẹo trong điều kiện chiếu sáng liên tục trước và sau khi đồng nuôi cấy, do đó ở giai đoạn đồng nuôi cấy

việc sử dụng cùng điều kiện chiếu sáng liên tục không những không ảnh hưởng đến sự phát triển của mô mà còn gia tăng hiệu quả chuyển gen hơn là đồng nuôi cấy ở điều kiện tối.

3.3 Ảnh hưởng của mannose lên quá trình tạo chồi

Kết quả Hình 2A cho thấy những mô sẹo nào đã phát triển tốt trên môi trường RO5 khi được chuyển sang nuôi cấy trên môi trường tiền tạo chồi RO6 không bổ sung mannose có sự phát triển rất tốt (đạt tỷ lệ 100%), mô sẹo tiếp tục tăng sinh khối và bung ra thành nhiều cụm nhỏ rời rạc. Trong khi phần lớn các mô sẹo được nuôi ở môi trường RO6 + 2% mannose có dấu hiệu nâu hóa và không phát triển, sự phát triển chỉ đạt 15,6%, thấp hơn 6 lần so với trên môi trường không có sự hiện diện của mannose. Sự phát triển và không phát triển của mô chuyển gen trên hai môi trường cũng được thể hiện ở Hình 3A,B.

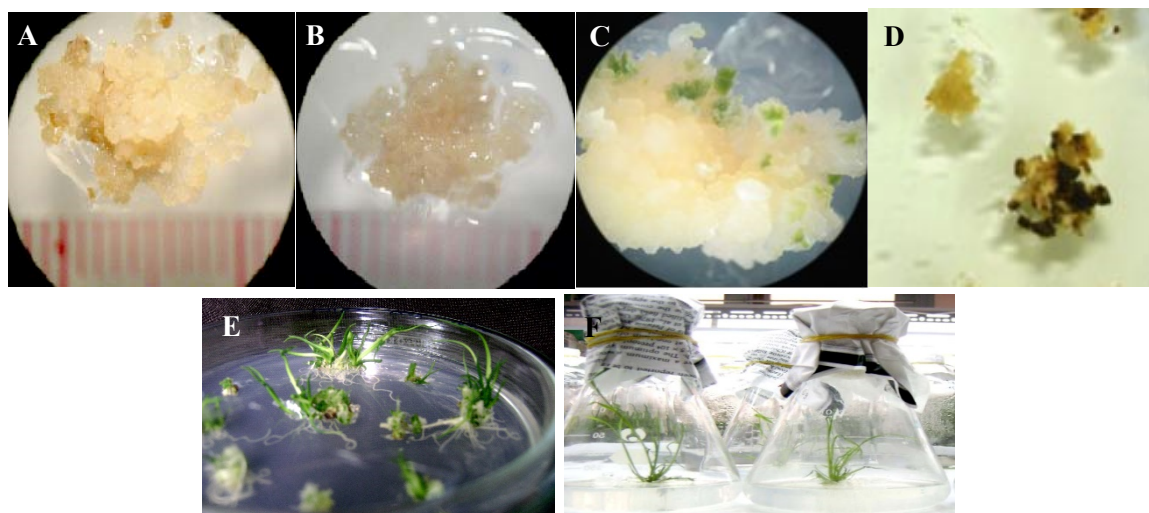


Hình 2: Sự phát triển của mô sẹo chuyển gen trên môi trường tiền tạo chồi (A), Sự phát triển của mô sẹo chuyển gen trên môi trường tạo chồi (B)

Ảnh hưởng của mannose lên sự tạo chồi thể hiện rõ nhất trên môi trường RO7, chỉ sau 1 tuần nuôi cấy trên môi trường RO7, các đốm màu xanh có thể nhìn thấy bằng mắt, quan sát các đốm xanh này dưới kính lúp soi nổi thấy rõ các cấu trúc hình cầu đang biệt hóa thành chồi, Hình 2B cho thấy hầu hết các mô sẹo được nuôi cấy trên môi trường RO7 không chứa mannose đều tạo được chồi (đạt 97,8%) trong khi đó trên môi trường RO7 + 1,5% mannose chỉ đạt 11,1% và phần lớn các mô đã bị hóa đen sau đó (Hình 3C,D).

Hầu như các nghiên cứu có sử dụng gen chọn lọc PMI đều sử dụng mannose trong môi trường chọn lọc ở giai đoạn kích thích tạo mô sẹo. Trần Thị Cúc Hòa và Bùi Bá Bồng (2003) sử dụng mannose trên môi trường kích thích tạo mô sẹo ở lúa với nồng độ từng bước tăng dần và nồng độ sucrose thì giảm dần, cụ thể là 3% sucrose và 2,5% mannose ở 2 tuần lễ chọn lọc đầu tiên, trong 2 tuần chọn lọc kế tiếp đã sử dụng 1,5% sucrose và 2,5%

mannose và sau đó tăng nồng độ mannose đến 3,5% trong khi sucrose chỉ còn 0,5% ở giai đoạn chọn lọc sau cùng. Trong báo cáo của Lucca *et al.* (2001), đã sử dụng nồng độ cao mannose trong các giai đoạn chọn lọc mô sẹo lúa với 3% sucrose và 3% mannose ở 2 tuần lễ chọn lọc đầu tiên, 2 tuần lễ chọn lọc kế tiếp đã sử dụng 1,5% sucrose và 3% mannose, hai tuần lễ chọn lọc sau cùng sử dụng 0,5% sucrose và 5% mannose. Nồng độ mannose cần thiết để chọn lọc hiệu quả ở lúa japonica và indica là cao hơn so với báo cáo về củ cải đường (Joersbo *et al.*, 1998) hoặc lúa mì và ngô (Wright *et al.*, 2001). Nồng độ sucrose đã từng bước giảm dần để cân bằng áp suất thẩm thấu của môi trường và giúp ngăn chặn sự phát triển của các tế bào không được chuyển gen. He *et al.* (2004) đã sử dụng 2% mannose kết hợp với 0,5% sucrose trên môi trường tạo sẹo đã nhận được 6,0% lúa Japonica giống Ishikari-shiroge là chuyển gen.



Hình 3: A: Mô sẹo trên môi trường RO6; B: Mô sẹo trên môi trường RO6 + 2% mannose; C: Hình thành chồi trên môi trường RO7; D: Mô sẹo hóa đen trên môi trường RO7 + 1,5% mannose; E&F: Mô sẹo hình thành chồi và rễ

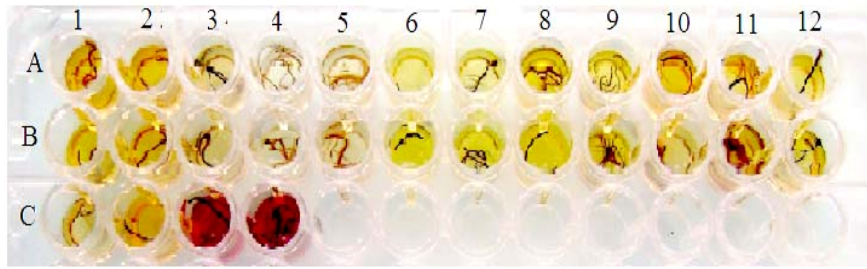
Trần Thị Cúc Hòa và Bùi Bá Bồng (2003) thấy rằng sử dụng 0,5% sucrose trong giai đoạn chọn lọc lần ba đã có hiện tượng một số mô sẹo không chuyển gen vẫn sống được trên môi trường chọn lọc mannose. Tương tự như vậy, Wright *et al.* (2001) cũng báo cáo rằng việc thêm một lượng nhỏ sucrose trong giai đoạn sau cùng của sự chọn lọc cũng cho phép một số mô sẹo thoát khỏi sự chọn lọc. Tuy nhiên, Lucca *et al.* (2001) cho thấy với nồng độ mannose được sử dụng trong môi trường chọn lọc là 5% và mặc dù có bổ sung 0,5% sucrose nhưng không có mô sẹo nào thoát khỏi sự chọn lọc này, điều này có ý nghĩa rằng không có bất kỳ mô sẹo nào sống được trên môi trường chọn lọc mannose với nồng độ cao lại là mô sẹo chưa chuyển gen. Gui *et al.* (2014) đã kết luận rằng nồng độ tối đa của mannose trong môi trường chọn lọc tạo mô sẹo trong khoảng 0,75 – 1%, vượt quá giới hạn này sẽ ảnh hưởng nghiêm trọng đến khả năng tạo sẹo của lúa indica giống IR58025B. Vì vậy, trong nghiên cứu này, để đạt hiệu quả chọn lọc cao nhất, đã sử dụng mannose khá cao 4% và không bổ sung sucrose.

Trong khi đường mannose được thêm vào trong môi trường tạo mô sẹo để thanh lọc cây chuyển gen và đã được chứng minh có hiệu quả cao thì các môi trường tạo chồi và rễ đều được khuyến cáo không nên sử dụng mannose vì quá trình hình thành chồi và rễ rất nhạy cảm với loại đường này. Theo Lucca *et al.* (2001), sử dụng 2% mannose trong môi trường tạo rễ đã ức chế hoàn toàn sự phát triển của cây lúa và các cây chuyển gen bị chết trong vòng một vài tuần. Ở củ cải đường nồng độ 0,3% đã ức

chế hoàn toàn sự hình thành chồi (Joersbo *et al.*, 1998). Khi nghiên cứu ảnh hưởng của mannose lên sự tạo chồi của cải bắp chuyển gen, cũng cho thấy rằng môi trường có 2% sucrose và 0-0,3% mannose thì quá trình tạo chồi phát triển bình thường, khi sử dụng mannose nồng độ 0,4% hoặc hơn thì quá trình tạo chồi hoàn toàn không xảy ra (Min *et al.*, 2007). Cùng kết luận như vậy, Hu *et al.*, 2016 cũng không sử dụng mannose trong môi trường tạo chồi và rễ ở lúa, trong khi đó Gui *et al.* (2014) đã sử dụng 0,5% mannose trong môi trường tạo chồi và không sử dụng mannose trên môi trường tạo rễ ở lúa. Báo cáo của Gadaleta *et al.* (2006) đã sử dụng 0,5% mannose trên môi trường tạo chồi và khi bổ sung 1,5% mannose trên môi trường tạo rễ của lúa mì đã nhận thấy những cây lúa mì chuyển gen đều có rễ phát triển rất chậm, bộ rễ nhỏ và không có lông rễ.

3.4 Thử nghiệm CPR

Sau khi cây lúa chuyển gen đã phát triển thành chồi và khi chồi có chiều dài khoảng 2-3 cm thì chuyển sang môi trường tạo rễ RO9 (Hình 3E,F) và trước khi cây con được đem ra trồng trong nhà lưới, rễ của cây được phân tích bằng phương pháp khảo sát CPR. Trong dung dịch chứa chất chỉ thị CPR, nếu pH của dung dịch là 6,0 hoặc lớn hơn thì dung dịch có màu đỏ đậm. Nhưng khi dung dịch thử nghiệm bị acid hóa do hoạt động chuyển hóa mannose của các tế bào sống sẽ làm cho môi trường có màu vàng. Trong 26 dòng lúa được cho là chuyển gen vì đã sống sót trên môi trường chọn lọc RO5 được cắt lấy một đoạn rễ 0,5 cm để phân tích CPR.



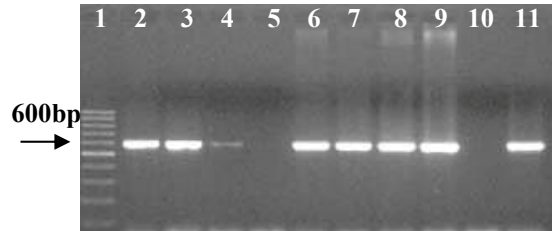
Hình 4: Thử nghiệm CPR: A1-C2: cây chuyển gen; C3-C4: cây không chuyển gen

Kết quả từ Hình 4 đã cho thấy 100% rễ của các dòng này đều đổi sang màu vàng trong khi rễ của cây không chuyển gen do không có khả năng chuyển hóa mannose nên không xảy ra hiện tượng acid hóa, vì vậy màu của dung dịch không bị thay đổi.

Phân tích cây chuyển gen bằng phương pháp đánh giá sự chuyển đổi màu qua khảo sát CPR được chứng minh là một phương pháp nhanh chóng và nhạy cảm để đánh giá khả năng chịu mannose và qua đó đã gián tiếp đánh giá được sự biểu hiện của gen PMI, vì vậy mà ở hầu hết các nghiên cứu sử dụng gen chọn lọc PMI đều phải trải qua phân tích CPR. Lucca *et al.* (2001) kết luận rằng rễ sau một giờ tiền xử lý với mannose trước khi ủ 4 ngày với dung dịch thử nghiệm đã cho thấy đây là bộ phận hiệu quả hơn trong việc dùng làm vật liệu cho phân tích CPR ở cây lúa. Tương tự như vậy, Trần Thị Cúc Hòa và Bùi Bá Bổng (2003) cũng sử dụng rễ mẫu lúa chuyển gen và Zhang *et al.*, 2015 sử dụng rễ mía 0,5 cm để phân tích CPR. Bên cạnh đó, lá cũng được sử dụng để làm vật liệu khảo sát CPR trong chuyển gen chọn lọc bằng PMI ở các cây khác như bắp (Wright *et al.*, 2001), lúa mì (Gadaleta *et al.*, 2006); lá đậu đũa (Bakshi *et al.*, 2012). Báo cáo của Feeney and Punja (2003) thì sử dụng mô sẹo 0,6 cm² của cây gai dầu (*Cannabis sativa*) để khảo sát.

3.5 Nhận diện bước đầu cây chuyển gen bằng phân tích PCR

Sự hòa nhập của gen PMI trong các cây được cho là chuyển gen thể hệ T0 đã được phân tích bằng kỹ thuật PCR. Qua phân tích sản phẩm PCR của các dòng lúa sống được trên môi trường chọn lọc 4% mannose (RO5) và có kết quả dương tính với khảo sát CPR cho thấy 100% mẫu đều có sản phẩm PCR 600 bp trong khi DNA từ lúa không chuyển gen đã không khuếch đại được bất kỳ sản phẩm PCR nào (Hình 5).



Hình 5: Sản phẩm PCR (giếng 1: thang chuẩn 100 bp, giếng 5: lúa không chuyển gen, giếng 2-4 và 6-9: lúa chuyển gen, giếng 10: nước, giếng 11: plasmid chứa vector chuyển gen)

4 KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã hoàn chỉnh được một quy trình chuyển gen với dòng lúa Taipei 309 sử dụng PMI như là gen chọn lọc, trong giai đoạn lây nhiễm mô sẹo được xử lý gây tổn thương và đồng nuôi cấy trong điều kiện chiếu sáng liên tục đã tăng hiệu quả chuyển gen. Sử dụng mannose trong môi trường chọn lọc tạo chồi là không cần thiết vì mannose ức chế quá trình hình thành chồi. Mặc dù môi trường tạo chồi và rễ không sử dụng mannose để thanh lọc nhưng tất cả các dòng lúa đều được xác nhận bước đầu là cây chuyển gen.

LỜI CẢM TẠ

Tác giả xin gửi lời cảm ơn đến PGS.TS. Trần Thị Cúc Hòa, Viện lúa Đồng bằng sông Cửu Long đã cung cấp vector pCAMBIA 1380-PMI và giống lúa Taipei 309 và xin cảm ơn GS. Geert Angenon, Trưởng Bộ môn Di truyền thực vật, Viện Sinh học phân tử, Đại học mở Brussel (VUB), Vương quốc Bỉ đã hỗ trợ kinh phí cho công trình nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ahsan, N., Lee, S.H., Lee, D.G., Anisuzzaman, M., Alam, M.F., Yoon, H.S., Choi, M.S., Yang, J.K. and Lee, B.H., 2007. The effects of wounding type, preculture, infection method and cocultivation temperature on the *Agrobacterium*-mediated gene transfer in tomatoes. *Annals of Applied Biology*. 151 (3): 363-372.

- Ayres, N.M. and Park, W.D., 1994. Genetic transformation of rice. *Crit. Rev. Plant Sci.* 13: 219–239.
- Bakshi, S., Saha, B., Roy, N.K., Mishra, S., Panda, S.K. and Sahoo, L., 2012. Successful recovery of transgenic cowpea (*Vigna unguiculata*) using the 6-phosphomannose isomerase gene as the selectable marker. *Plant Cell Rep.* 31:1093-1103.

- Christou, P., Ford, T. and Kofron, M., 1991. Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants from agronomically important indica and japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. *BioTechnology.* 9: 957-962.