

NGHIÊN CỨU CHUYỂN GEN *EcHB1* LÀM TĂNG CHIỀU DÀI SỢI GỖ CHO DÒNG BẠCH ĐÀN LAI UP THÔNG QUA *Agrobacterium tumefaciens*

Trần Thị Thu Hà^{1*}, Lê Thị Thủy¹, Nguyễn Thị Huyền¹, Nguyễn Thị Việt Hà¹,
Trần Đức Vượng¹, Lê Sơn¹, Nguyễn Đức Kiên¹, Nguyễn Hữu Sỹ¹, Tô Nhật Minh²,
Đào Thị Thuỳ Trang², Phùng Thị Kim Huệ²

¹ Viện Nghiên cứu Giống và Công nghệ Sinh học Lâm nghiệp

Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam

² Trường PTTH chuyên Hùng Vương - Gia Lai

TÓM TẮT

Gen *EcHB1* là gen giúp tăng chiều dài sợi gỗ cho bạch đàn đã được phân lập từ bạch đàn grandis (*E. grandis*). Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành chuyển gen *EcHB1* vào bạch đàn lai UP (*E. urophylla* × *E. pellita*) thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*. Kết quả nghiên cứu đã xác định ngưỡng nồng độ chất chọn lọc kanamycin tối khả năng sống của mẫu là 150 mg/l và tối khả năng ra rễ của chồi là 50 mg/l. Sử dụng dịch khuẩn *A. tumefaciens* nồng độ OD₆₀₀ = 0,5 để biến nạp gen *EcHB1* trong dung dịch huyền phù có bổ sung 100 μM Acetosyringone vào bạch đàn lai UP với thời gian biến nạp 10 phút. Sau 72 giờ đồng nuôi cấy, các đoạn thân và lá đã biến nạp gen được tái sinh trên môi trường chọn lọc MS* bổ sung 0,5 mg/l BAP, 0,2 mg/l NAA, 400 mg/l Cefotaxim và 150 mg/l Kanamycin. Sau ba lần chọn lọc trên môi trường tái sinh, các chồi bạch đàn lai UP chuyển gen được cấy trên môi trường ra rễ chọn lọc có bổ sung 50g/l Kanamycin. Kết quả phân tích cây chuyển gen giai đoạn vườn ươm bằng phương pháp PCR đã khẳng định sự có mặt của gen *EcHB1* trong cây bạch đàn lai UP.

Từ khóa: Bạch đàn lai UP, chuyển gen, chiều dài sợi gỗ, gen *EcHB1*

Introduction of the *EcHB1* gene into *E. urophylla* × *E. pellita* hybrid via *Agrobacterium tumefaciens*

The gene *EcHB1*, is isolated from *E. grandis*, encoding for increasing the wood fiber length was transferred into superior clones of *E. urophylla* × *E. pellita* (UP hybrid) via *Agrobacterium tumefaciens*. Use *A. tumefaciens* concentration of OD₆₀₀ = 0.5 to transform the *EcHB1* gene in the suspension solution with 100 μM Acetosyringone into UP hybrid for 10 mins. After 72 hours of co-culture, the transgenic stem and leaf segments were regenerated on MS* selective medium supplemented with 0.5 mg/l BAP, 0.2 mg/l NAA, 400 mg/l Cefotaxim and 150 mg/l Kanamycin. After three selections on the regenerative medium, transgenic UP hybrid shoots were transplanted on selective rooting medium supplemented with 50 g/l Kanamycin. Results of the analysis of nursery plants by PCR method confirmed the presence of the *EcHB1* gene in the UP hybrid tree.

Keywords: UP hybrid, transgenic, wood fiber length, *EcHB1* gene,

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Bạch đàn lai UP là giống lai giữa hai loài Bạch đàn *urophylla* và Bạch đàn *pellita* (*E. urophylla* × *E. pellita*) đang ngày càng được ưa chuộng trong sản xuất. Chúng được đánh giá có ưu thế lai và sinh trưởng tốt hơn bố mẹ của chúng. Gần đây, công nghệ gen được ghi nhận là một giải pháp quan trọng và rất hữu hiệu trong chọn tạo giống mới. Thông qua việc sử dụng các kỹ thuật trong công nghệ gen cho phép tạo ra những giống cây trồng mới; đột phá về năng suất, chất lượng cũng như khả năng chống chịu. Không những thế cây trồng tạo ra từ công nghệ gen có nhiều đặc tính ưu việt mà cây trồng hoang dại ban đầu không có được. Vì thế, một số dòng bạch đàn lai UP đã được công nhận là giống quốc gia và giống tiên bộ kỹ thuật được chọn lọc để làm nguồn vật liệu ban đầu cho chuyển gen làm tăng chiều dài sợi gỗ.

Để chuyển thành công các gen có giá trị vào cây bạch đàn UP cần phải có một quy trình tái sinh cây hiệu quả cao từ mô sẹo thông qua tạo đa chồi trực tiếp hoặc tạo phôi soma. Quy trình tái sinh cây một số loài bạch đàn phục vụ chuyển gen đã được các nhà khoa học nghiên cứu. Bandyopadhyay và đồng tác giả (1999) đã tiến hành tái sinh thành công hai loài bạch đàn *E. nitens* và *E. globulus* từ vật liệu mảnh cây của cây mầm; Cid và đồng tác giả (1999) đã tiến hành tái sinh loài bạch đàn lai *E. grandis* × *E. urophylla* từ vật liệu cuống lá cây mầm; nghiên cứu tái sinh loài bạch đàn *E. tereticornis* thông qua phôi soma cũng đã được Parakash và đồng tác giả (2005) công bố. Dibax và đồng tác giả (2010) tái sinh loài bạch đàn *E. camaldulensis*; Huang và đồng tác giả (2010) đã xây dựng thành công quy trình tái sinh cho loài bạch đàn *E. urophylla* từ đỉnh thân mầm. Cho đến nay, nhiều loài bạch đàn đã được nghiên cứu tái sinh thành công thông qua tạo đa chồi hoặc phôi soma từ các vật liệu là mảnh lá, thân cây mầm (Ho *et al.*, 1998; Dibax *et al.*, 2005; Tournier *et al.*, 2003). Trên

cơ sở các quy trình tái sinh được xây dựng, một số quy trình chuyển gen vào nhiều loài bạch đàn đã được các nhà khoa học thực hiện thành công bằng việc chuyển các gen chỉ thị, gen chọn lọc và đang áp dụng hiệu quả để chuyển các gen có giá trị. Tetsukawazu và đồng tác giả (2003) đã được cấp bằng sáng chế về quy trình chuyển gen *gus* vào loài bạch đàn *E.camaldulensis*, *E.globulus*, *E.grandis*, *E.grandis* × *E.urophylla* và *E.urophylla* từ các mẫu cây sinh dưỡng lấy từ cây bạch đàn trưởng thành; Cheng và đồng tác giả (2006) cũng đã được cấp bằng sáng chế về quy trình chuyển gen và chọn lọc cây chuyển gen cho loài bạch đàn *E. urophylla*. Các kết quả nghiên cứu cho thấy khi sử dụng các loài bạch đàn, dòng bạch đàn khác nhau thì cho hiệu suất chuyển gen khác nhau. Do vậy, để chuyển gen hiệu quả vào từng loài bạch đàn và từng dòng bạch đàn cụ thể cần có một quy trình thích hợp.

Xuất phát từ cơ sở trên chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu chuyển gen *EcHBI* vào cây bạch đàn lai UP thông qua *A. tumefaciens* với mục đích tạo nguồn vật liệu gen ban đầu phục vụ cho công tác tạo giống bạch đàn biến đổi gen phục vụ mục tiêu cải thiện giống theo hướng chất lượng gỗ.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu thực vật

Đoạn thân, lá non không chứa chồi nách của bạch đàn lai UP đã được nghiên cứu tái sinh thông qua phôi soma được cung cấp bởi Viện Nghiên cứu Giống và Công nghệ Sinh học Lâm nghiệp, Viện Khoa học Lâm nghiệp Việt Nam.

2.2. Chủng vi khuẩn sử dụng trong chuyển gen

Chủng vi khuẩn *A. tumefaciens* C58 mang vector pGWB2 bao gồm promoter CamV - 35S, gen *EcHBI* và gen kháng kháng sinh Kanamycin, được cung cấp bởi Viện nghiên cứu RIKEN (Nhật Bản).

2.3. Phương pháp nghiên cứu

2.3.1. Phương pháp xác định ngưỡng nồng độ chất chọn lọc Kanamycin

Xác định ngưỡng nồng độ chất chọn lọc Kanamycin tới khả năng sống sót của mẫu

Đoạn thân bạch đàn lai UP có kích thước khoảng 0,5 cm không chứa mắt được nuôi cấy trên môi trường chọn lọc: MS* (giảm ½ Nitơ tổng số) + 20 g/l sucrose + 0,5 mg/l BAP + 0,2 mg/l NAA + 100 ml/l nước dừa + 2,4 g/l Phytigel + 400 mg/l Cefotaxim có bổ sung các công thức nồng độ kháng sinh Kanamycin khác nhau: 0 mg/l, 10 mg/l, 50 mg/l, 75 mg/l, 100 mg/l, 150 mg/l. Đặt các mẫu nuôi cấy trong phòng nuôi, dưới giàn đèn ánh sáng trắng. Theo dõi và thống kê tỉ lệ sống của mẫu ở từng công thức.

Xác định ngưỡng nồng độ chất chọn lọc Kanamycin tới khả năng ra rễ

Các chồi bạch đàn lai UP có chiều cao 3 - 5 cm với 4 - 6 nách lá được cấy trên môi trường ra rễ: ½ MS + 2 mg/l IBA + 1 mg/l NAA + 15 g/l sucrose + 7 g/l Agar có bổ sung chất chọn lọc Kanamycin với các nồng độ khác nhau: 0 mg/l, 10 mg/l, 25 mg/l, 50 mg/l. Thống kê số mẫu ra rễ, xác định tỷ lệ mẫu ra rễ ở mỗi công thức thí nghiệm.

2.3.2. Phương pháp chuyển gen vào cây bạch đàn lai UP thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens*

Tạo vật liệu tiền nuôi cấy trước khi chuyển gen:

Đoạn thân được cắt thành những đoạn dài 0,3 - 0,5 cm. Mảnh lá có giữ lại cuống được nuôi

cây trên môi trường tiền nuôi cấy: MS* (giảm ½ Nitơ tổng số) + 20 g/l sucrose + 0,5 mg/l BAP + 0,2 mg/l NAA + 100 ml/l nước dừa + 2,4 g/l Phytigel + 100 μM AS với các công thức thời gian tiền nuôi cấy là 24, 48, 72, 96 và 120 giờ trước khi chuyển gen.

Nuôi cấy tạo khuẩn lạc: Chủng *A. tumefaciens* mang vector pGWB2 được cất giữ trong Glycerol ở - 80°C. Cấy trái vi khuẩn trên lên đĩa môi trường LB đặc bổ sung 50 mg/l Kanamycin, 50 mg/l Rifamycin, nuôi ở 28°C trong 2 ngày.

Tạo dịch huyền phù vi khuẩn: Chọn một khuẩn lạc cho vào 2 ml môi trường LB lỏng bổ sung 50 mg/l Kanamycin và 50 mg/l Rifamycin. Nuôi lắc 200 vòng/phút, ở 28°C, trong 14 - 16 giờ. Sau đó hút 1 ml dịch vi khuẩn cho vào 50 ml LB lỏng bổ sung 50 mg/l Kanamycin và 50 mg/l Rifamycin, nuôi trong 4 - 5 giờ. Dịch vi khuẩn được ly tâm lạnh ở tốc độ 5.000 vòng/phút, trong 10 phút. Loại bỏ dịch nổi và hoà tan cặn vi khuẩn trong môi trường 1/2 MS lỏng, pha loãng cho tới khi dịch có OD₆₀₀ ≈ 0,5.

Nhiễm khuẩn và đồng nuôi cấy:

Mẫu sau xử lý, chuẩn bị cho biến nạp được ngâm trong dung dịch huyền phù vi khuẩn với các khoảng thời gian: 5, 10, 15, 20 phút, sau đó thấm khô mẫu bằng giấy thấm vô trùng và chuyển mẫu sang môi trường đồng nuôi cấy. Môi trường đồng nuôi cấy được bổ sung thêm Acetosyringone (AS) với nồng độ 100 μM. Đồng nuôi cấy ở 25°C, trong buồng tối với các ngưỡng thời gian là 24, 48, 72, 96 và 120 giờ. Theo dõi khả năng nhiễm khuẩn và tỷ lệ sống của các mẫu nuôi cấy.

Bảng 1. Thành phần môi trường nuôi cấy *A. tumefaciens*

Môi trường	Thành phần
LB đặc	5 g/l Yeast extract + 10 g/l NaCl + 10 g/l Trypton + 15 g/l Bactor agar, pH = 7
LB lỏng	5 g/l Yeast extract + 10 g/l NaCl + 10 g/l Tryptone, pH = 7
Dịch lỏng tạo huyền phù vi khuẩn	Môi trường cơ bản 1/2 MS

Diệt khuẩn và tái sinh chồi chuyển gen:

Các mẫu sau khi đồng nuôi cấy, được rửa bằng nước cất vô trùng 3 - 4 lần có bổ sung 500 mg/l Cefotaxim trong 10 phút. Thâm khô mẫu, chuyển lên môi trường nuôi diệt khuẩn và tái sinh chồi. Môi trường diệt khuẩn và tái sinh gồm MS* + 0,5 mg/l BAP + 0,2 mg/l NAA + 15 mg/l Riboflavin + 400 mg/l Cefotaxim. Nuôi dưới ánh sáng trắng, trong 4 ngày.

Tái sinh chọn lọc và tạo mô sẹo

Lá, đoạn thân chuyển gen sau 4 ngày nuôi cấy trên môi trường không có Kanamycin được cấy chuyển sang môi trường chọn lọc và phát sinh mô sẹo gồm: MS* + 0,5 mg/l BAP + 0,2 mg/l NAA + 15 mg/l Riboflavin + 400 mg/l Cefotaxim + 150 mg/l Kanamycin và nuôi dưới ánh sáng trắng, sau 21 - 28 ngày khối mô sẹo được hình thành trên môi trường chọn lọc (có thể lặp lại 2 - 3 lần bước tái sinh chọn lọc).

Chọn lọc cây chuyển gen ở giai đoạn ra rễ

Sau khoảng 8 tuần, các khối mô sẹo bật chồi trên môi trường chọn lọc và được tiếp tục cấy chuyển 3 tuần/lần. Các chồi phát triển tốt sau 3 - 4 lần chọn lọc được cấy chuyển sang môi trường ra rễ chọn lọc: 1/2 MS + 2 mg/l IBA + 1 mg/l NAA + 15 g/l sucrose + 7 g/l Agar + 50 mg/l Kanamycin.

2.3.3. Phân tích cây chuyển gen bằng phương pháp sinh học phân tử

Quy trình tách chiết ADN tổng số

Các mẫu bạch đàn chuyển gen (mẫu lá được thu sau khi đưa ra vườn ươm từ 1 - 2 tháng tuổi) được tách chiết ADN tổng số theo phương pháp CTAB (Doyle và Doyle, 1987) có cải tiến một số bước. Kiểm tra độ sạch trên gel Agarose 0,9% và đo nồng độ ADN tổng số trên máy quang phổ hấp phụ.

Kiểm tra sự có mặt của gen *EcHB1*

Để xác định sự có mặt của gen *EcHB1* trong các dòng cây bạch đàn chuyển gen, sử dụng kỹ

thuật PCR để nhân gen *EcHB1* từ genome của cây chuyển gen bằng cặp mồi đặc hiệu CAM 35S - F : 5' - CTT CGC AAG ACC CTT CCT C - 3' và *EcHB1* - R: 5' - TTA ACA AGC GGC TGA TGG ATG AGC - 3'. Thành phần phản ứng PCR trong 25 µl gồm: 12,5 µl PCR master mix (2X), 1 µl mồi xuôi CAM 35S - F (10 µM) và 1 µl mồi ngược *EcHB1* - R (10 µM), 3µl ADN tổng số hàm lượng 30 ng/µl và 7,5 µl dH₂O. Chương trình chạy PCR: 95°C trong 3 phút; 95°C trong 1 phút, 56°C trong 1 phút, 72°C trong 1 phút, lặp lại 35 chu kỳ; 72°C trong 7 phút, bảo quản ở 4°C. Sản phẩm PCR được kiểm tra bằng điện di trên gel Agarose 1%.

2.3.4. Phương pháp bố trí thí nghiệm

Thí nghiệm được bố trí hoàn toàn ngẫu nhiên với 3 lần lặp; các mẫu thí nghiệm được đặt trong tủ tối hoặc trên giàn đèn có cường độ ánh sáng 2000 lux, chu kỳ 16 giờ sáng, 8 giờ tối tùy theo thí nghiệm. Nhiệt độ phòng nuôi cấy điều chỉnh ở mức 26 ± 2°C.

Các số liệu được thu thập, xử lý tính toán theo phương pháp phân tích thống kê toán học. Quá trình xử lý số liệu được thực hiện trên máy tính sử dụng hàm thống kê Anova để phân tích phương sai một nhân tố với ba lần lặp.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Xác định ngưỡng nồng độ chất chọn lọc Kanamycin

Trong quá trình chuyển gen, việc chọn lọc và xác định được các cá thể mang gen chuyển là một khâu hết sức quan trọng. Để công tác chọn lọc hiệu quả cần thiết lập được một môi trường chọn lọc với ngưỡng phù hợp để có thể loại bỏ phần lớn các cá thể không mang gen chuyển đồng thời giữ lại được toàn bộ các cá thể đã được chuyển gen. Gen làm tăng chiều dài sợi gổ *EcHB1* nằm trong vector pGWB2. Ngoài gen đích vector này còn mang gen *nptII* kháng Kanamycin (Km), được biểu hiện cùng với

gen đích nên cá thể biểu hiện gen này thường được đánh giá sơ bộ là mang gen đích. Do đó, gen kháng Kanamycin được coi là yếu tố chọn lọc cá thể mang gen được chuyển. Vì vậy, chúng tôi đã tiến hành xác định ngưỡng nồng độ của Kanamycin để chọn lọc hiệu quả cây

bạch đàn lai UP chuyển gen bằng việc thử nghiệm các nồng độ Kanamycin từ 0 mg/l đến 150 mg/l cho các đoạn thân được cắt từ bạch đàn lai UP chưa chuyển gen. Kết quả được trình bày trong bảng 2 sau đây.

Bảng 2. Ảnh hưởng của Kanamycin tới khả năng sống của đoạn thân Bạch đàn lai UP

Công thức	Kan (mg/l)	Tỷ lệ mẫu sống sau 2 tuần (%)	Tỷ lệ mẫu sống sau 3 tuần (%)	Tỷ lệ mẫu sống sau 4 tuần (%)
ĐC	0	100	100	100
1	10	97,8	86,7	75,6
2	50	86,7	64,4	44,4
3	75	72,2	27,8	13,3
4	100	53,3	16,7	8,9
5	150	18,3	0	0

Sau 4 tuần nuôi cấy cho thấy, Kanamycin ảnh hưởng trực tiếp tới tỷ lệ sống sót của đoạn thân. Tỷ lệ sống sót của đoạn thân giảm mạnh từ 75,6% (10 mg/l Kanamycin) xuống còn 8,9% (100 mg/l Kanamycin). Khi tăng nồng độ Kanamycin lên 150 mg/l, không còn mẫu nào sống được trên môi trường này (ở nồng độ 150 mg/l, tất cả các mẫu đều đã chết từ tuần thứ 3 theo dõi). Căn cứ vào các kết quả trên, chúng tôi lựa chọn nồng độ Kanamycin là 150 mg/l làm cơ sở để chọn lọc các mẫu bạch đàn lai chuyển gen ở các thí nghiệm tiếp theo. Giải thích hiện tượng các mô, tế bào bị hoá nâu hay bạch tạng, không phát triển rồi chết trên môi trường có bổ sung kháng sinh, hiện tượng này là do các mô tế bào này không mang gen ngoại lai

nptII. Do đó, trên môi trường nuôi cấy có chứa Kanamycin, các mô tế bào đã bị kháng sinh này ức chế làm mất sức sống và khả năng phát triển của mẫu. Còn các mẫu sống sót trên môi trường có chứa kháng sinh là do tế bào có thể đã mang gen *nptII* mã hóa cho kanamycin phosphotransferase làm mất hoạt tính của Kanamycin nên mô thực vật vẫn phát triển tốt.

Ngoài ra, trong nghiên cứu này chúng tôi tiến hành thử nghiệm bổ sung để đánh giá khả năng ra rễ của chồi Bạch đàn lai UP không chuyển gen ở những mức nồng độ Kanamycin khác nhau, từ đó tìm được nồng độ chọn lọc Kanamycin thích hợp cho chọn lọc cây chuyển gen ở giai đoạn ra rễ.

Bảng 3. Ảnh hưởng của Kanamycin đến khả năng ra rễ của Bạch đàn lai UP

Công thức	Kan (mg/l)	Tỷ lệ ra rễ sau 1 tuần (%)	Tỷ lệ ra rễ sau 2 tuần (%)	Tỷ lệ ra rễ sau 3 tuần (%)
ĐC	0	11,3	70,0	95,3
1	10	0	0	18,7
2	25	0	0	4,7
3	50	0	0	0

Kết quả thu được cho thấy, khi nồng độ Kanamycin bổ sung vào môi trường lên đến 50 mg/l thì mẫu cây không chuyển gen bị ức chế hoàn toàn khả năng ra rễ, trong khi ở công thức ĐC (không bổ sung Kanamycin) thì tỷ lệ

ra rễ đạt 95,3%. Ở khoảng nồng độ 10 - 25 mg/l Kanamycin bổ sung vào môi trường, khả năng ra rễ của bạch đàn lai UP bị ức chế rõ rệt, tuy nhiên mức độ ức chế ra rễ ở mỗi nồng độ là khác nhau. Điều dễ nhận thấy đó là sự sụt

giảm đáng kể tỷ lệ mẫu cấy ra rễ: ở công thức bổ sung 10 mg/l Kanamycin thì tỷ lệ ra rễ sau 3 tuần chỉ đạt 18,7%. Trên môi trường bổ sung 25 mg/l Kanamycin thì tỷ lệ ra rễ sụt giảm chỉ còn 4,7%. Ở môi trường bổ sung 50 mg/l Kanamycin thì hầu như mẫu cấy nào cũng bị ức chế ra rễ, sau 3 tuần không có chồi nào có thể ra rễ, mẫu chồi nuôi cấy bị thâm đen và chết. Kết quả này cũng trùng hợp với các nghiên cứu của Cheng và đồng tác giả (2006); Tounier và đồng tác giả (2003). Do vậy, lựa chọn Kanamycin ở nồng độ 50 mg/l để chọn lọc cây bạch đàn lai UP chuyển gen ở giai đoạn ra rễ là thích hợp.

3.2. Ảnh hưởng của thời gian tiền nuôi cấy tới khả năng biến nạp gen

Thời gian tiền nuôi cấy (TNC) là khoảng thời gian mà mẫu cấy được nuôi cấy trên môi trường

tái sinh trước khi tiến hành quá trình lây nhiễm vi khuẩn, trong thời gian này các tế bào, mô tiến hành quá trình phân chia mạnh mẽ. Vi khuẩn *A. tumefaciens* có khả năng chuyển gen tốt hơn đối với các tế bào, mô đang phân chia. Nhưng khoảng thời gian tiền nuôi cấy là bao nhiêu thì tốt nhất để cho khả năng biến nạp gen của vi khuẩn vào mô, tế bào cao nhất lại cần được nghiên cứu.

Mẫu đoạn thân và lá được cắt theo kích thước thích hợp rồi cấy lên môi trường tiền nuôi cấy (MS* + 0,5 mg/l BAP + 0,2 mg/l NAA + 100 µM AS). Mẫu được nuôi cấy cảm ứng tạo mô sẹo ở các khoảng thời gian: 24 giờ, 48 giờ, 72 giờ, 96 giờ và 120 giờ trước khi thực hiện biến nạp trong 10 phút. Kết quả thí nghiệm sau 2 tuần biến nạp được trình bày tại bảng 4 sau đây.

Bảng 4. Ảnh hưởng của thời gian tiền nuôi cấy đến khả năng tạo mô sẹo của mẫu được biến nạp gen

Công thức	Thời gian TNC (giờ)	Tỷ lệ đoạn thân tạo mô sẹo (%)	Tỷ lệ mẫu lá tạo mô sẹo (%)
ĐC	0	13,3	12,2
1	24	57,8	55,6
2	48	67,8	66,7
3	72	77,8	74,4
4	96	94,4	86,7
5	120	84,4	72,2

Thời gian tiền nuôi cấy có tác động trực tiếp tới khả năng chuyển gen của vi khuẩn thông qua chỉ tiêu tỷ lệ mẫu cấy tạo mô sẹo. Ở công thức đối chứng, không thực hiện tiền nuôi cấy, tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo ở đoạn thân chỉ đạt 13,3%, con số này ở mẫu lá là 12,2%. Tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo tăng mạnh khi có tác động của thời gian tiền nuôi cấy, dao động từ 57,8 - 94,4% ở đoạn thân, 55,6 - 86,7% ở mẫu lá. Hiệu quả cao nhất là công thức 4 (thời gian tiền nuôi cấy là 96 giờ), tuy nhiên khi tiếp tục tăng thời gian tiền nuôi cấy lên 120 giờ, mẫu tạo mô sẹo có xu hướng giảm xuống (chỉ còn 84,4% ở đoạn thân và 72,2% ở mẫu lá).

3.3. Ảnh hưởng của thời gian nhiễm khuẩn tới khả năng biến nạp gen

Thời gian nhiễm khuẩn không chỉ quyết định tới khả năng xâm nhiễm của vi khuẩn vào mẫu biến nạp mà còn ảnh hưởng trực tiếp tới khả năng sống sót của mẫu trên môi trường chọn lọc. Để đánh giá ảnh hưởng của thời gian nhiễm khuẩn tới khả năng biến nạp gen, chúng tôi bố trí thí nghiệm theo 5 công thức với các khoảng thời gian biến nạp 0, 5, 10, 15 và 20 phút với *A. tumefaciens*.

Bảng 5. Ảnh hưởng của thời gian nhiễm khuẩn đến khả năng biến nạp gen

Công thức	Thời gian nhiễm khuẩn (phút)	Đoạn thân		Lá	
		Tỷ lệ mẫu sống (%)	Tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo (%)	Tỷ lệ mẫu sống (%)	Tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo (%)
ĐC	Không nhiễm khuẩn	91,1	0,0	85,5	0,0
1	5	83,3	27,8	81,1	23,3
2	10	81,1	44,4	70,3	46,7
3	15	72,2	38,9	64,2	32,2
4	20	55,6	33,3	54,5	28,9

Kết quả nghiên cứu chỉ ra thời gian nhiễm khuẩn có ảnh hưởng đến tỷ lệ sống của mẫu cấy, thời gian nhiễm khuẩn càng lâu thì tỷ lệ sống của mẫu càng giảm do mẫu bị ngâm lâu trong dung dịch khuẩn dễ bị úng và nhiễm lại. Đối với công thức ĐC không nhiễm khuẩn thì tỷ lệ mẫu sống trên môi trường đồng nuôi cấy không bổ sung kháng sinh (MS* + 0,5 mg/l BAP + 0,2 mg/l NAA + 100 μ M AS) đạt 91,1%, tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo là 0,0% vì trên môi trường tái sinh có bổ sung thêm 150 mg/l Kanamycin làm mẫu bị thâm đen và chết. Tỷ lệ sống của mẫu cấy giảm từ 83,3 - 5 phút biến nạp xuống còn 55,6 - 20 phút biến nạp (đoạn thân), từ 81,1 - 5 phút biến nạp xuống còn 54,5 - 20 phút biến nạp (lá). Do vậy, thời gian biến nạp phải đảm bảo làm sao đủ thời gian cho vi khuẩn xâm nhiễm hiệu quả mà mẫu cấy vẫn có sức sống tốt để thuận lợi cho việc tái sinh ở giai đoạn sau. Ở thời gian nhiễm khuẩn 10 phút cho tỷ lệ mẫu cấy tạo mô sẹo cao nhất đạt 44,4% đối với đoạn thân và 46,7% đối với lá.

3.4. Ảnh hưởng của thời gian đồng nuôi cấy tới khả năng biến nạp gen

Thời gian đồng nuôi cấy mẫu là khoảng thời gian mà mẫu cấy đã lây nhiễm với *A. tumefaciens*

được nuôi cấy trên môi trường đồng nuôi cấy, môi trường này vừa chứa các chất cần thiết cho mô, tế bào thực vật sinh trưởng và phát triển, lại vừa chứa các yếu tố hoạt hóa quá trình chuyển gen của vi khuẩn vào tế bào thực vật. Do vậy, thời gian đồng nuôi cấy thích hợp sẽ tạo điều kiện cho vi khuẩn xâm nhiễm và tiến hành quá trình chuyển gen vào mô thực vật, đồng thời sẽ giúp cho bước diệt khuẩn, phục hồi cũng như chọn lọc về sau được dễ dàng. Vì vậy, chúng tôi tiến hành thí nghiệm này nhằm tìm ra thời gian đồng nuôi cấy phù hợp đảm bảo cho hiệu quả chuyển gen tốt nhất và không ảnh hưởng đến sức sống và khả năng tái sinh của mẫu cấy sau này. Mẫu qua tiền nuôi cấy trong 2 ngày và được biến nạp với *A. tumefaciens* trong 10 phút, sau đó được đồng nuôi cấy trong các khoảng thời gian 24, 48, 72, 96, 120 giờ. Tỷ lệ mẫu sống sau biến nạp và tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo, đánh giá sau 2 tuần biến nạp trên môi trường chọn lọc tạo mô sẹo (MS* + 0,5 mg/l BAP + 0,2 mg/l NAA + 15 mg/l Riboflavin) có bổ sung 400 mg/l Cefotaxim, 150 mg/l Kanamycin.

Bảng 6. Ảnh hưởng của thời gian đồng nuôi cấy đến khả năng biến nạp gen

Công thức	Thời gian đồng nuôi cấy (giờ)	Đoạn thân		Lá	
		Tỷ lệ mẫu sống (%)	Tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo (%)	Tỷ lệ mẫu sống (%)	Tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo (%)
1	24	91,1	23,7	89,0	25,3
2	48	88,1	46,1	87,7	47,4
3	72	87,8	48,5	87,5	49,6
4	96	72,4	45,6	75,0	46,3
5	120	60,5	33,7	61,7	34,0

Thời gian đồng nuôi cấy từ 24 - 72 giờ thì tỷ lệ mẫu sống sau diệt khuẩn đạt kết quả cao tương ứng 91,1% và 87,8% ở đoạn thân, 89% và 87,5% ở lá; nhưng khi kéo dài thời gian đồng nuôi cấy lên 120 giờ thì kết quả mẫu sống sau diệt khuẩn giảm xuống còn 60,5% ở đoạn thân và 61,7% ở lá. Kết quả này có thể lý giải là do thời gian đồng nuôi cấy dài đã tạo điều kiện thuận lợi cho *A. tumefaciens* phát triển nhanh và bao trùm kín toàn bộ mẫu cấy, khiến mẫu cấy bị nhiễm khuẩn nặng, thâm dần và chết.

Như vậy, có thể nhận định rằng, thời gian đồng nuôi cấy thích hợp nhất cho việc chuyển gen vào bạch đàn lai UP là 72 giờ, với tỷ lệ mẫu sống sau đồng nuôi cấy là 87,8% ở đoạn thân và 87,5% ở lá, tỷ lệ mẫu tạo mô sẹo sau 2 tuần chuyển gen là 48,5% và 49,6% tương ứng ở đoạn thân và lá. Kết quả này phù hợp với nhận định của Cheng và cộng sự (2006) khi tiến hành chuyển gen trên đối tượng bạch đàn *E. grandis* × *E. urophylla* cũng như *E. camaldulensis*.



Hình 1. Mẫu đồng nuôi cấy với thời gian lần lượt là 72, 96, 120 giờ

3.5. Đánh giá khả năng tái sinh chồi sau chuyển gen

Sau 3 ngày đồng nuôi cấy tiến hành rửa khuẩn với nước cất có bổ sung 500 mg/l Cefotaxim và cấy chuyển lên môi trường diệt khuẩn và tái sinh chồi có bổ sung 400 mg/l Cefotaxim, nuôi trong 4 ngày dưới ánh sáng trắng. Sau đó, mẫu được chuyển sang môi trường có thành phần

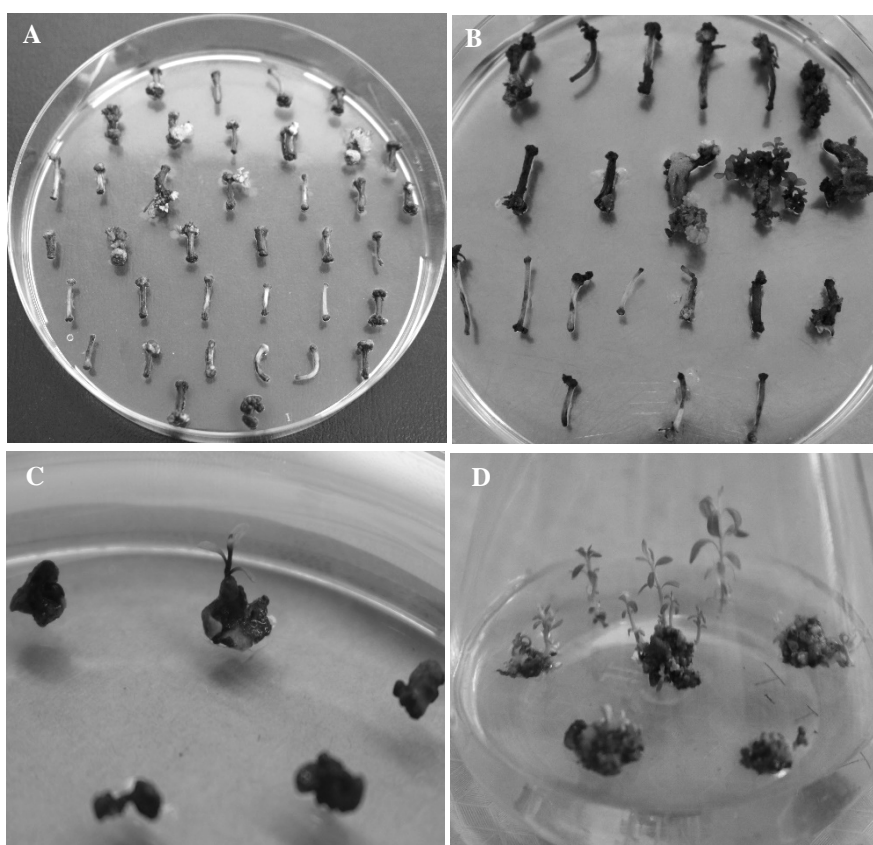
tương tự nhưng bổ sung thêm chất chọn lọc Kanamycin 150 mg/l. Sau 4 tuần các mẫu mô sẹo cứng, có màu xanh/hồng được cấy sang môi trường chọn lọc tái sinh chồi có bổ sung 150 mg/l Kanamycin để sàng lọc chồi chuyển gen. Kết quả chồi tái sinh thu được trên môi trường chứa Kanamycin 150 mg/l được thể hiện trong bảng 7.

Bảng 7. Khả năng tái sinh chồi của mẫu chuyển gen

Vật liệu	Số lần lặp	Số mẫu TN	Số mẫu sống tái sinh chồi (mẫu)	Tỷ lệ mẫu sống tái sinh chồi (%)	Số chồi tái sinh (chồi)
ĐC	1	57	-	-	-
	2	53	-	-	-
	3	60	-	-	-
	TB				
Thân mầm	1	275	16	5,8	56
	2	256	13	5,1	46
	3	264	14	5,3	51
	TB			5,4	
Lá mầm	1	262	14	5,3	57
	2	267	11	4,1	49
	3	283	14	4,9	57
	TB			4,8	

Trên môi trường tái sinh có chứa Kanamycin 150 mg/l, đoạn thân cho tỷ lệ mẫu sống tái sinh chồi đạt 5,4% trên tổng số mẫu thí nghiệm; với lá thì tỷ lệ này trung bình đạt 4,8% trên tổng số mẫu. Trong khi ở công thức đối chứng (công thức sử dụng vật liệu chưa được chuyển gen) thì không có mẫu nào tái sinh chồi trên môi trường có kháng sinh Kanamycin 150 mg/l. Như vậy, hiệu quả chọn

lọc của kháng sinh Kanamycin 150 mg/l đối với Bạch đàn lai UP là thích hợp cho việc sàng lọc mẫu giai đoạn đầu. Số chồi tái sinh trên môi trường chọn lọc có bổ sung 150 mg/l Kanamycin ở 3 lần lặp thu được tổng cộng được 316 chồi (153 chồi từ đoạn thân và 163 chồi từ lá). Các chồi này là những chồi sống sót, hình thái bình thường (sau 2 lần được cấy chuyển trên môi trường chọn lọc).



Hình 2. Chồi chuyển gen *EctHB1* tái sinh trên môi trường chọn lọc chứa Kanamycin 150 mg/l

A: Mẫu thân trên môi trường chọn lọc lần 1

B: Mẫu thân trên môi trường chọn lọc lần 2

C: Mẫu lá trên môi trường chọn lọc

D: Chồi chuyển gen trên MT nhân nhanh chọn lọc

3.6. Đánh giá khả năng ra rễ và kiểm tra chồi chuyển gen

Các chồi sau biến nạp sống được trên môi trường tái sinh chồi có chứa chất chọn lọc Kanamycin 150 mg/l và có chiều cao đạt từ 2 - 2,5 cm được tách thành từng chồi đơn lẻ và cấy chuyển sang môi trường ra rễ ($\frac{1}{2}$ MS + 2 mg/l IBA + 1 mg/l NAA + 15 g/l sucrose + 7

g/l Agar) có bổ sung 50 mg/l Kanamycin. Sau 2 lần cấy chuyển trên môi trường ra rễ, các chồi ra rễ và sinh trưởng tốt sẽ được kiểm tra sự hiện diện của gen *EctHB1* bằng phản ứng PCR với cặp mồi đặc hiệu CAM 35S - F và *EctHB1* - R. Kết quả thí nghiệm được trình bày trong bảng 8.

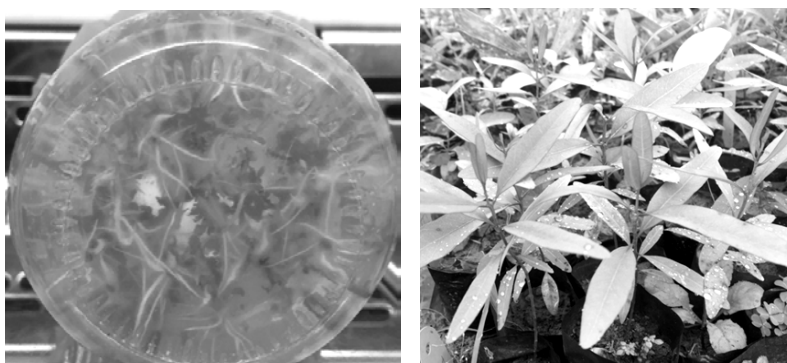
Bảng 8. Kết quả kiểm tra khả năng ra rễ của chồi sau chuyển gen

Vật liệu	Tổng chồi	Số chồi ra rễ lần 1	Số chồi ra rễ lần 2	Số chồi (+) với PCR	Tỷ lệ (%)
ĐC	58	0	0		
	49	0	0		
	57	0	0		
	TB				
Thân mầm	58	4	7	2	3,7
	49	3	5	1	2,0
	57	4	6	2	3,5
	TB				3
Lá mầm	54	3	6	3	5,5
	49	3	3	2	4,0
	38	4	3	2	5,2
	TB				5

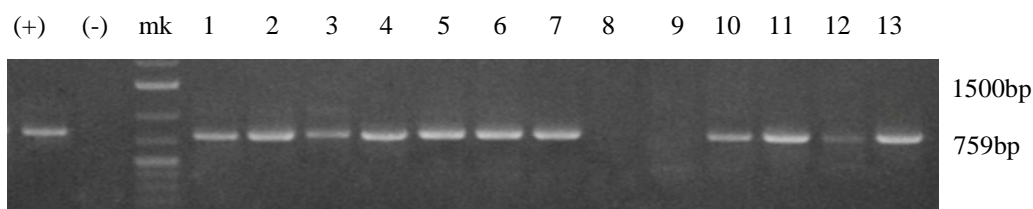
Số chồi tái sinh thành cây hoàn chỉnh và sinh trưởng tốt trên môi trường ra rễ chọn lọc lần 1 chứa Kanamycin 50 mg/l thu được 11 chồi trên tổng số 164 chồi (tương ứng với 6,7%) ở đoạn thân và 10 chồi trên tổng số 141 chồi (tương ứng 7,1%) ở lá. Trên môi trường ra rễ chọn lọc lần 2 (Kanamycin 50 mg/l) đạt 18 chồi trên tổng số 164 chồi (10,9%) - đoạn thân và 12 trên tổng số 141 chồi (8,5%) - lá. Phần

còn lại không ra rễ, sinh trưởng chậm hoặc ngừng sinh trưởng, trong khi đối chứng (chồi không chuyển gen) 100% chồi không ra rễ, héo dần và chết.

Các chồi đã ra rễ, tạo thành cây hoàn chỉnh được trồng ra vườn ươm để thu lá và tách chiết ADN tổng số rồi chạy phản ứng PCR kiểm tra sự có mặt của gen *EcHB1* với cặp môi đặc hiệu CAM 35S - F và *EcHB1* - R.



Hình 3. Bịch đàn chuyển gen ra rễ trên môi trường chọn lọc và Cây con vườn ươm



Hình 4. Kết quả kiểm tra sự có mặt của gen *EcHB1* bằng PCR

Chú thích: (+): Plasmid mang gen *EcHB1*; (-): dòng bịch đàn lai UP không chuyển gen; mk: DNA marker 1 kb; giếng số 1 - 13: UP72.1, UP72.2, UP72.4, UP72.5, UP72.6, UP72.8, UP72.10, UP72.11, UP72.13, UP72.19, UP72.20, UP72.22, UP72.30

Kết quả điện di trên hình 4 cho thấy trong số 13 dòng bạch đàn lai UP chuyển gen được kiểm tra sự có mặt của gen *EcHB1* bằng PCR, có 11 dòng (UP72.1, UP72.2, UP72.4, UP72.5, UP72.6, UP72.8, UP72.10, UP72.19, UP72.20, UP72.22, UP72.30) xuất hiện một băng duy nhất với kích thước khoảng 759bp tương đương với kích thước của gen *EcHB1* xuất hiện trên đối chứng dương. Với cây đối chứng âm không chuyển gen thì không hiện băng. Như vậy, bước đầu đã tạo được 11 dòng bạch đàn lai UP chuyển gen *EcHB1* dương tính với PCR.

IV. KẾT LUẬN

Quy trình chuyển gen *EcHB1* vào bạch đàn lai UP thông qua *A. tumefaciens* đạt hiệu quả đã được hoàn thiện. Sử dụng đoạn thân và lá non để tiên nuôi cấy 96 giờ làm thể nhận gen, thời

gian nhiễm khuẩn 10 phút sau đó đồng nuôi cấy 72 giờ, chọn lọc chồi chuyển gen trên môi trường tái sinh bổ sung 150 mg/l Kanamycin và chọn lọc cây chuyển gen ở giai đoạn ra rễ trên môi trường ra rễ bổ sung 50 mg/l Kanamycin.

Áp dụng quy trình chuyển gen đã tạo được 11 dòng Bạch đàn lai UP chuyển gen *EcHB1* dương tính với PCR.

Lời cảm ơn: Bài báo là một phần kết quả của đề tài “Nghiên cứu tạo giống bạch đàn lai biến đổi gen cho chiều dài sợi gỗ (giai đoạn 2)”. Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn người thẩm định đã góp ý để hoàn thiện bài báo. Xin trân trọng cảm ơn Bộ Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn đã tài trợ kinh phí nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bandyopadhyay S., Cane K., Rasmussen G., Hamill J.D., 1999. Efficient plant regeneration from seedling explants of two commercially important temperate *Eucalyptus* species - *Eucalyptus nitens* and *E. globulus*. *Plant Sci* 140 (2):189 - 198.
2. Cid L.P.B., Machado A.C.M.G., Carvalheira S.B.R.C., Brasileiro A.C.M, 1999. Plant regeneration from seedling explants of *E. grandis* × *E. urophylla*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 56: 17 - 23.
3. Cheng, 2006. *Eucalyptus urophylla* transformation and selection. Patent: US20060101537 A1.
4. Dibax R., Eisfeld C.L., Cuquel F.L., Koehler H., Quoirin M., 2005. Plant regeneration from cotyledonary explants of *Eucalyptus camaldulensis*. *Science Agriculture (Piracicaba, Braz.)* 62: 406 - 412.
5. Dibax R., Deschamps C., Bepalhok Filho J.C., Vieira E., Molinari C., Campos D., Quoirin M., 2010. Organogenesis and *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation of *Eucalyptus saligna* with P5CS gene. *Biol Plant* 54(1): 6 - 12.
6. Doyle, J.J., Doyle, J.J., 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: p. 13 - 15.
7. Ho C.K., Chang S.H., Tsay J.Y., Tsai C.J., Chiang V.L., Chen Z.Z., 1998. *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation of *Eucalyptus camaldulensis* and production of transgenic plants. *Plant Cell Rep* 17: 675 - 680.
8. Huang Z.C., Zeng F.H., Lu X.Y., 2010. Efficient regeneration of *Eucalyptus urophylla* from seedling - derived hypocotyls. *Biologia Plantarum* 54 (1): 131 - 134.
9. Prakash M.G. and Gurumurthi K., 2005. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus tereticornis* Sm. *Current Science* 88: 1311 - 1316.
10. Tournier V., Grat S., Marque C., Kayal W., Penchel R., Andrade D.G., Boudet A.M., Teulieres C., 2003. An efficient procedure to stably introduce genes into an economically important pulp tree (*Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla*). *Trans Res* 12: 403 - 411.

Email tác giả chính: tranthuhadc@gmail.com

Ngày nhận bài: 29/12/2018

Ngày phản biện đánh giá và sửa chữa: 06/01/2019

Ngày duyệt đăng: 28/03/2019