

THỬ NGHIỆM CHUYỂN GEN KHÁNG SÂU TRÊN CÂY CÀ CHUA (*LYCOPERSICON ESCULENTUM* MILL.) *IN VITRO* BẰNG VI KHUẨN *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

Hà Trần Minh Dũng, Dương Ngọc Kiều Thi¹, Lê Tấn Đức và Nguyễn Hữu Hồ²

ABSTRACT

The suitable regenerating medium for 10-day old cotyledon of tomato was MS containing 0.5 mg/l BA, 0.5 mg/l kinetin, 0.1 mg/l IAA and 8.4 g/l agar. pH was adjusted at 5.8. The lethal dose of kanamycin on cotyledonary segments (control) was 100 mg/l. The introduction of plasmid pCAMBIA 2301 – CryIAb into Agrobacterium tumefaciens strain LBA 4404 and the presence of CryIAb gene were tested by PCR technique. The OD_{600nm} = 1 and 100 μM acetosyringone resulted in the highest transient GUS activity (45.6 ± 5.1%) on transgenic cotyledonary fragments. The presence of CryIAb gene in 2-week old cotyledonary fragments and 3-month old transgenic tomato in vitro plants was evidenced by PCR.

Keywords: *CryIAb gene, Agrobacterium tumefaciens LBA 4404, Hong Chau tomato variety, Lycopersicon esculentum Mill.*

Title: *Production of insects-resistant transgenic tomato plants via Agrobacterium tumefaciens*

TÓM TẮT

Môi trường tái sinh chồi cây cà chua in vitro từ lá mầm là MS có bổ sung 0,5 mg/l BA, 0,5 mg/l kinetin, 0,1 mg/l IAA, 8,4 g/l agar và pH 5,8; ngưỡng gây chết của kanamycin sulphate đối với lá mầm đối chứng là 100 mg/l. Việc biến nạp plasmid pCAMBIA 2301 – CryIAb vào Agrobacterium tumefaciens dòng LBA 4404 và kiểm tra gen CryIAb đã được thực hiện thành công với sản phẩm khuếch đại của gen CryIAb là 559 bp. Mật độ OD_{600nm} = 1 và 100 μM acetosyringone cho tỷ lệ biểu hiện GUS cao nhất với 45,6 ± 5,1%. Kết quả PCR cho thấy có sự hiện diện của gen CryIAb ở một số lá mầm chuyển gen 2 tuần tuổi và lá cà chua 3 tháng tuổi.

Từ khóa: *Gen CryIAb, Agrobacterium tumefaciens LBA 4404, cà chua Hồng Châu, Lycopersicon esculentum Mill.*

1 MỞ ĐẦU

Cà chua (*Lycopersicon esculentum* Mill.) là loại cây trồng được canh tác và tiêu thụ phổ biến trên thế giới. Diện tích cà chua trên thế giới hiện nay khoảng 3,7 triệu ha và tổng sản lượng đạt khoảng 100 triệu tấn (FAOSTAT, 2001). Tuy nhiên, sản lượng cà chua luôn bị giới hạn do các stress sinh học và phi sinh học gây ra. Vì vậy, việc tạo ra tính kháng cho cây luôn là mục tiêu hàng đầu của các chương trình lai tạo giống. Hơn thế nữa, những biện pháp lai tạo truyền thống thường tốn rất nhiều thời gian, trung bình mất khoảng 6 – 8 năm để cho ra được một giống mới. Trong những thập niên gần đây, các thành tựu về công nghệ tế bào và công nghệ

¹ Ban Quản lý Khu Nông nghiệp Công nghệ cao, Tp. Hồ Chí Minh

² Phòng Công nghệ Gen, Viện Sinh học Nhiệt đới, Tp. Hồ Chí Minh

gen đã góp phần đáng kể vào việc nâng cao hiệu suất cũng như rút ngắn thời gian của quá trình chọn giống.

Giống cà chua Hồng Châu (Syngenta) đang được người nông dân ưa chuộng vì có nhiều đặc điểm tốt về mặt nông học và phẩm chất trái cao. Quả cứng, thịt quả dày, không bị nứt quả, ít hao hụt khi vận chuyển xa. Khối lượng quả từ 80 - 120 g, năng suất trung bình từ 2,5 – 3,5 kg/cây, độ Brix 4,5 - 5,0% phù hợp với nhu cầu ăn tươi và chế biến.

Hiện nay đã có rất nhiều nghiên cứu chuyển gen trên đối tượng này nhằm xác định chức năng của gen, tạo tính trạng kháng sâu, bệnh, thuốc diệt cỏ, cải tiến chất lượng quả, làm chậm thời gian chín của quả, tạo protein mới (Park *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2004; Davuluri *et al.*, 2005). Trong thực tế, hiệu suất chuyển gen có sự khác biệt rất lớn qua các báo cáo (Roekel *et al.*, 1993; Hamza và Chupeau 1993; Frary và Earle 1996; Ling *et al.*, 1998; Park *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2006; và Qiu *et al.*, 2007). Nguyên nhân của sự khác biệt phụ thuộc vào độc lực của từng dòng vi khuẩn, mức độ miễn dịch của giống, loại mẫu sử dụng, mật độ vi khuẩn, gen chọn lọc, acetosyringone và pH. Do đó, mục tiêu của nghiên cứu này là nhằm xác định môi trường phù hợp cho công tác tái sinh cây cà chua *in vitro* từ lá mầm, tạo dòng vi khuẩn mang gen mục tiêu và thiết lập quy trình chuyển gen phù hợp cho giống Hồng Châu.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Vật liệu

Hạt cà chua Hồng Châu (Syngenta), môi trường MS (Murashige và Skoog) bổ sung 30 g/l sucrose, 8,4 g/l agar với các nồng độ BA, kinetin và IAA khác nhau để tạo chồi. Môi trường gieo hạt gồm ½ MS với các thành phần đa lượng, vi lượng, vitamin MS và đường giảm một nửa, 8,4 g/l agar. Môi trường được điều chỉnh pH 5,8 trước khi hấp khử trùng ở 121⁰C, 1 atm trong 20 phút.

Môi trường LB (Luria – Bertani), enzyme cắt giới hạn *Hind*III (Promega), kit Wizard^R Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega), plasmid pCAMBIA 2301 – *Cry*Lab, agarose (Invitrogen), ethidium bromide (Invitrogen), *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404, cefotaxime (Việt Nam), kanamycin sulphate (Invitrogen), glucose (Sigma), acetosyringone (Acros), X – Gluc (Acros), Fe-EDTA (Merck), BA (Merck), kinetin (Aldrich Chem. Co.), IAA (Merck), agar (Việt Nam).

Bồn điện di (Biorad), pipetman (Eppendorf), máy ly tâm (Scientz DGW-99 High-Speed Micro Centrifuge) (Mỹ), máy chụp GelDoc (Biorad), máy đo mật độ quang (OD) (Thermo), tủ lạnh ổn định nhiệt Innova 4320 (Brunswick Scientific), máy PCR Techine TC-512 (Anh), tủ cấy vô trùng (Shisaeng, Hàn Quốc).

2.2 Phương pháp

2.2.1 Xây dựng hệ thống tái sinh cà chua *in vitro*

(a) Môi trường tái sinh cà chua *in vitro*

Lá mầm 10 ngày tuổi được cắt bỏ đầu và cuống lá, sau đó đem cấy lá vào môi trường các môi trường tái sinh và so với đối chứng MS bổ sung 8,4 g/l agar và

30 g/l sucrose. Các nghiệm thức là môi trường MS bổ sung 0,5; 1; 1,5 và 2 mg/l BA; 0,5; 1; 1,5; 2 mg/l kinetin và 0,1 mg/l IAA.

(b) Môi trường ra rễ in vitro

Chồi cà chua đạt kích thước trung bình 1 – 2 cm, có màu xanh đậm, khỏe mạnh được tách ra và cấy vào môi trường MS để tạo rễ và cây hoàn chỉnh.

2.2.2 Xác định ngưỡng gây chết của kanamycin đối với lá mầm cà chua

Chúng tôi tiến hành khảo sát ảnh hưởng của chất chọn lọc kanamycin lên khả năng tái sinh chồi từ lá mầm cà chua nhằm xác định nồng độ tối thiểu gây ức chế khả năng tái sinh của chất chọn lọc kanamycin cho thí nghiệm chuyển gen trong quá trình chọn lọc sơ bộ những mẫu chuyển gen giả định. Thí nghiệm được tiến hành trên môi trường thích hợp từ kết quả khảo sát khả năng tái sinh, bổ sung chất chọn lọc kanamycin với các nồng độ khác nhau theo bảng 1.

Bảng 1: Các nghiệm thức khảo sát sự ảnh hưởng của chất chọn lọc kanamycin lên mẫu lá mầm

Nghiệm thức	K0	K20	K30	K40	K50	K60
Nồng độ kanamycin (mg/l)	0	20	30	40	50	60

Mỗi nghiệm thức được thực hiện với 24 mẫu lá mầm, tiến hành song song với mẫu đối chứng. Cứ 3 tuần cấy truyền 1 lần. Kết quả được ghi nhận sau 6 tuần nuôi cấy.

Khảo sát ảnh hưởng của chất chọn lọc kanamycin lên mẫu lá mầm:

Sau 6 tuần, chúng tôi quan sát và ghi nhận khả năng tái sinh trên môi trường tái sinh bổ sung chất chọn lọc kanamycin với các nồng độ khác nhau theo bảng 1. Thí nghiệm khảo sát 24 mẫu ứng với từng nồng độ kanamycin.

2.2.3 Nhân bản plasmid CAMBIA 2301-Cry1Ab trong *E. coli* và kiểm tra kích thước plasmid bằng enzyme cắt giới hạn

Plasmid mang gen *Cry1Ab* nằm trong *E. coli* được nhân bản trong môi trường LB trước khi tách chiết plasmid. Vi khuẩn được nhân lên bằng cách lắc trong môi trường LB có bổ sung 50 mg/l kanamycin sulphate qua đêm ở nhiệt độ 37⁰C.

Plasmid sau đó được cắt giới hạn với enzyme *HindIII* và điện di sản phẩm để kiểm tra. Theo dự kiến sau khi được cắt, trên bản gel sẽ có hai vạch DNA với kích thước 11,6 kb tương ứng với plasmid gốc pCAMBIA 2301 và đoạn 4,2 kb tương ứng với đoạn cassette chứa gen. Đoạn cassette mang 3 gen là *nptII* quy định tính trạng kháng kanamycin, gen *Cry1Ab* kháng côn trùng bộ cánh vảy Lepidoptera và gen chỉ thị *GUS*. Cassette trên được thiết kế với promoter Maize Ubiquitin và terminator *NOS*.

2.2.4 Biến nạp plasmid vào vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* và xác định sự hiện diện của gen *Cry1Ab*

Cho 5 µl TE chứa plasmid vào 100 µl dịch tế bào *Agrobacterium tumefaciens* khả nạp, tác động nhiệt bằng cách cho ống Eppendorf chứa dịch vi khuẩn vào trong nơơ lỏng 90 giây, đặt lại dịch vi khuẩn vào bồn nước 37⁰C khoảng 5 phút. Sau đó cho hỗn hợp vào trong 1 ml LB không có kháng sinh và nuôi lắc (200 vòng/phút) ở 28⁰C trong 2 - 4 giờ. Ly tâm vi khuẩn trong 2 phút, thu tủa và hòa tan tủa vào 100 µl LB mới. Trãi dịch vi khuẩn lên môi trường LB thạch có 50 mg/l kanamycin

và 25 mg/l rifamycin, ủ ở 28⁰C trong 2 ngày. Cuối cùng chọn khuẩn lạc để kiểm tra plasmid.

2.2.5 Phân tích PCR để kiểm tra gen *CryIAb*

Plasmid pCambia2301-*CryIAb* sau khi tách chiết từ *Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404 được kiểm tra sự hiện diện của gen *CryIAb* bằng PCR. Trình tự primer để khuếch đại đoạn gen *CryIAb*: F: 5' – TTC CT T GGA CGA AAT CCC ACC - 3' và R: 5' – GCC AGA ATT GAA CAC ATG AGC GC - 3'. Chương trình nhiệt phản ứng PCR: 94⁰C trong 4 phút, 35 chu kỳ (94⁰C trong 30 giây, 54⁰C trong 1 phút, 72⁰C trong 1 phút), 72⁰C trong 10 phút. Kích thước đoạn gen *CryIAb* được khuếch đại là 559 bp.

2.2.6 Xây dựng quy trình chuyển gen

Chuẩn bị dung dịch vi khuẩn và mẫu lá mầm cà chua

Hai ngày trước khi chuyển gen, cây mẫu lá mầm cà chua 10 ngày tuổi vào môi trường MS bổ sung 0,1mg/l NAA và 1mg/l BA nhằm giúp lá mầm tăng cường tốc độ phân chia tế bào. Một ngày trước khi chuyển gen, nhân sinh khối *Agrobacterium tumefaciens* trong 20 ml Glucose lỏng, lắc 280 vòng/phút ở 28⁰C trong 24 giờ. Xác định mật độ vi khuẩn bằng cách đo chỉ số OD_{600nm}. Ly tâm 4.000 vòng/phút trong 10 phút ở 28⁰C để thu tủa. Tủa được pha vào glucose nồng độ 5,5 mM, pH 5,8 bổ sung acetosyringone 50; 100 và 150 μM tùy vào nghiệm thức.

Các bước chuyển gen

Cho lá mầm vào đĩa petri có dịch vi khuẩn, ngâm trong 30 phút. Sau đó chuyển mẫu lên giấy thấm vô trùng và cấy vào môi trường tái sinh có acetosyringone với nồng độ tương ứng như đã pha trong dịch vi khuẩn. Ủ mẫu 2 ngày ở 28⁰C và trong điều kiện tối.

Sau đó rửa sạch mẫu và cấy vào môi trường chọn lọc. Các bước như sau: Rửa 2 lần bằng nước vô trùng, lần cuối thêm 500 mg/l cefotaxime, lắc nhẹ 15 - 20 phút; chuyển mẫu lên giấy thấm sau đó cấy vào môi trường tái sinh có 50 mg/l kanamycin và 500 mg/l cefotaxime. Cây chuyển sau mỗi 15 ngày để tránh hiện tượng tái nhiễm. Sau 2 tháng, những chồi tái sinh sẽ được chuyển sang môi trường tái sinh với 50 mg/l kanamycin.

2.2.7 Phương pháp bố trí thí nghiệm

Khảo sát môi trường tạo chồi có 5 nghiệm thức tương ứng với 5 môi trường tạo chồi TC1 – TC5, 15 mẫu lá mầm/bình tam giác, 5 bình tam giác/nghiệm thức. Chỉ tiêu theo dõi là thời gian lá mầm bắt đầu tái sinh (tuần), phần trăm (%) số mẫu tái sinh /tổng số mẫu cấy và chiều cao chồi được đo từ bề mặt thạch lên đỉnh chồi (cm).

Thí nghiệm khảo sát ảnh hưởng của kanamycin lên sự tái sinh của lá mầm có 5 nghiệm thức tương ứng với 5 nồng độ kanamycin. Mẫu được cấy với mật độ 15 mẫu lá mầm/bình tam giác, 5 bình tam giác/nghiệm thức.

Trong thí nghiệm khảo sát mật độ vi khuẩn, chúng tôi sử dụng 150 lá mầm cho mỗi nghiệm thức. Sau khi tiền nuôi cấy 2 ngày trong môi trường TC2, mẫu lá sẽ

được đem ủ chung với *Agrobacterium tumefaciens* có OD_{600nm} bằng 0,5; 1 và 1,5 trong 30 phút.

Ở thí nghiệm đánh giá ảnh hưởng của acetosyringone, chất này được bổ sung vào huyền phù vi khuẩn với nồng độ 50; 100 và 150 µM. Mật độ vi khuẩn được cố định ở OD_{600nm} = 1.

Sau khi đồng nuôi cây, 30 mẫu lá mầm sẽ được chọn ngẫu nhiên từ mỗi nghiệm thức để nhuộm với X-Gluc nhằm kiểm tra sự biểu hiện của gen *GUS*. Tần suất chuyển gen tạm thời được tính trên số mẫu biểu hiện gen *GUS* /số mẫu đem nhuộm. Quy trình nhuộm *GUS* được thực hiện theo khuyến cáo của Jacobsen (2007).

2.2.8 Điều kiện thí nghiệm

Các thí nghiệm được thực hiện trong các điều kiện sau: chiếu sáng 16 giờ/ngày, cường độ ánh sáng 2.000 lux, nhiệt độ phòng 26 ± 2⁰C; độ ẩm trung bình: 75 - 80%.

2.2.9 Phương pháp phân tích và xử lý số liệu

Tất cả các thí nghiệm được bố trí theo kiểu hoàn toàn ngẫu nhiên (CRD) với 3 lần lặp lại cho mỗi thí nghiệm. Số liệu được xử lý bằng chương trình Minitab 16.1.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Quy trình tái sinh in vitro cho cây cà chua

Kết quả khảo sát môi trường tạo chồi được trình bày trong bảng 1.

Bảng 2: Kết quả khảo sát các môi trường tạo chồi cà chua từ lá mầm (4 tuần)

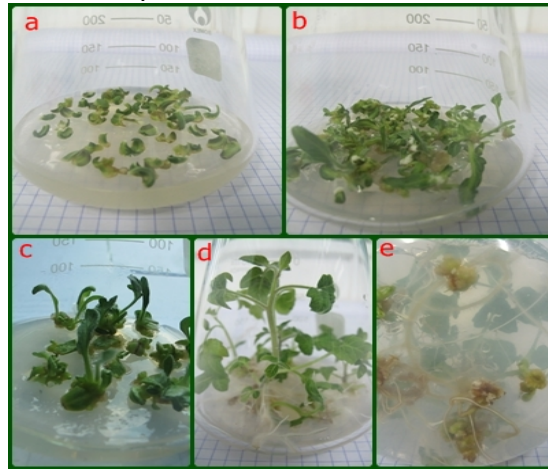
Môi trường	Tỷ lệ mẫu tạo chồi (%)	Chiều cao chồi (cm)
TC1	0 ^a	0
TC2	80,4 ^b ± 3,9	0,5 – 2
TC3	81,8 ^b ± 2,2	0,5 – 1
TC4	94,7 ^c ± 2,6	0,1
TC5	29,7 ^d ± 2,7	0,1
CV (%)	3,9	
p	0,000	

Ghi chú: Trong cùng một cột, các số trung bình có cùng chữ cái không có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê (p < 0,05). Kết quả được thể hiện bằng số trung bình ± độ lệch chuẩn. Trắc nghiệm phân hạng sẽ được thực hiện theo phương pháp Tukey.

Sau 5 tháng nuôi trong môi trường TC2, chồi đã phát triển thành cây hoàn chỉnh với chiều cao trung bình 7,7 cm và chiều dài rễ là 12 cm. Như vậy, môi trường thích hợp để tạo chồi và rễ cây cà chua in vitro là MS bổ sung 0,5 mg/l BA, 0,5 mg/l kinetin, 0,1 mg/l IAA + 30 g/l sucrose, 8,4 g/l agar và pH 5,8. Như vậy, qua các báo cáo có sự khác biệt rất lớn về thành phần nồng độ và chất điều hòa sinh trưởng sử dụng để tạo chồi cà chua in vitro (Park *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2006; Cortina và Macia 2004, Sharma *et al.*, 2009; Van T Dang *et al.*, 2010).

Theo Park *et al.* (2003), việc sử dụng zeatin và IAA sẽ cho kết quả tốt hơn so với sử dụng BA và NAA để tạo chồi cà chua từ lá thật, trụ dưới lá mầm và lá mầm. Tuy nhiên, khi sử dụng kết hợp giữa BA và IAA trong quá trình tạo chồi cà chua

thì sẽ cho kết quả tương tự như việc sử dụng riêng lẻ zeatin hoặc kết hợp giữa zeatin và IAA. Đối với giống Hồng Châu, việc sử dụng kết hợp giữa BA, kinetin và IAA cho kết quả tạo chồi rất tốt mà không cần sử dụng các chất điều hòa sinh trưởng đất liền như zeatin hoặc TDZ.



Hình 1: Quy trình nhân giống cà chua *in vitro* từ lá mầm. a. Lá mầm 1 tuần tuổi; b. Lá mầm 1 tháng tuổi; c. Chồi cà chua 3 tháng tuổi; d. Cây cà chua 5 tháng tuổi; e. Rễ cà chua

3.2 Ngưỡng gây chết của kháng sinh kanamycin lên khả năng tái sinh của lá mầm cà chua

Sau 6 tuần, chúng tôi quan sát và ghi nhận khả năng tái sinh trên môi trường tái sinh bổ sung chất chọn lọc kanamycin với các nồng độ khác nhau theo bảng 1. Thí nghiệm khảo sát 24 mẫu ứng với từng nồng độ kanamycin.

Kết quả đối với mẫu lá mầm:

Đối với mẫu đối chứng, tất cả mẫu đều tạo nhiều sẹo, màu xanh, chồi tái sinh khá nhiều và cao khoảng 2 cm, 87,5% mẫu tái sinh chồi.

Ở nghiệm thức K20, mẫu lá vẫn còn khả năng tái sinh chồi tuy ít hơn nhiều so với đối chứng. Ở nghiệm thức K30 và K40 hình thành mô sẹo ít nhưng sẹo nhỏ, nhiều mẫu không tái sinh nữa và tỉ lệ chồi tái sinh ít 8,3%. Tiến hành cấy chuyển mỗi ba tuần thì sau 6 tuần, mẫu lá mầm mất dần màu xanh.

Bảng 3: Ảnh hưởng nồng độ kanamycin lên khả năng tái sinh của lá mầm

Nghiệm thức	K0	K20	K30	K40	K50	K60
Số mẫu ban đầu	24	24	24	24	24	24
Số mẫu tái sinh chồi	21	6	2	2	0	0
Tỷ lệ tái sinh (%)	87,5	25	8,3	8,3	0	0

Từ nghiệm thức K50 đến K60, tất cả mẫu lá mầm không hình thành mô sẹo, các mẫu lá tuy có hơi tăng kích thước nhưng đều chuyển vàng hoặc nâu, vị trí vết cắt bị hóa nâu, phần rìa lá tiếp xúc môi trường bị nâu, mẫu mất khả năng tái sinh.

Như vậy, đối với mẫu lá mầm, chúng tôi chọn nồng độ kanamycin 50 mg/l là nồng độ tối thiểu ngăn cản khả năng tái sinh chồi của lá mầm. Kết quả này cũng phù hợp với khuyến cáo của Wu *et al.* (2006). Tuy nhiên, Park *et al.* (2003), Cortina và

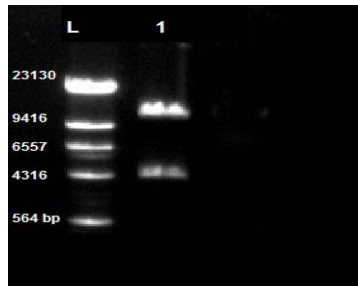
Macia (2004), Sharma *et al.* (2009) đã khuyến cáo sử dụng nồng độ 100 mg/l kanamycin để chọn lọc mô chuyển gen. Nguyên nhân của sự khác biệt có thể là do mức độ miễn dịch cũng như tuổi và loại mô cà chua đối với kanamycin.

3.3 Nhân bản plasmid CAMBIA 2301-*Cry1Ab* trong *E. coli* và kiểm tra plasmid bằng enzyme cắt giới hạn

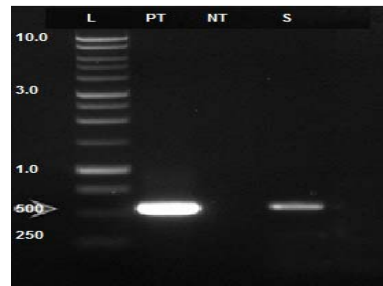
Kết quả điện di sản phẩm cắt bằng enzyme *Hind*III cho ra hai vạch DNA vạch thứ nhất có kích thước 11,6 kb phía trên và một vạch có kích thước khoảng 4,2 kb phía dưới (Hình 3). Từ đó có thể khẳng định plasmid được kiểm tra là pCAMBIA2301-*Cry1Ab* do sản phẩm xuất hiện trên bản gel đúng với kích thước mong đợi.

3.4 Biến nạp plasmid vào *Agrobacterium tumefaciens* và sự hiện diện của gen *Cry1Ab*

Sau quá trình biến nạp, chúng tôi đã nhận được 22 khuẩn lạc/đĩa petri trên môi trường có 50 mg/l kanamycin và 25 mg/l rifamycin. Để khẳng định dòng vi khuẩn này có chứa plasmid mang gen *Cry1Ab*, phản ứng PCR được thực hiện nhằm kiểm tra gen *Cry1Ab*. Kết quả điện di cho thấy có sản phẩm DNA với kích thước 559 bp (Hình 3). Điều này chứng tỏ chúng tôi đã tạo được dòng vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* phục vụ cho việc chuyển gen.



Hình 2: Kiểm tra plasmid pCAMBIA 2301-*Cry1Ab* được tách chiết từ vi khuẩn *E. coli* (L: Thang chuẩn DNA λ -*Hind*III; 1: Plasmid được cắt bằng enzyme *Hind*III (cho hai vạch DNA 11,6 kb và 4,2 kb)



Hình 3: Kết quả kiểm tra PCR gen *Cry1Ab* từ plasmid vi khuẩn *E. coli* và *Agrobacterium tumefaciens* (L: Thang chuẩn DNA 1 kb; PT: Băng DNA 559 bp khuếch đại từ plasmid *E. Coli*, NT: nước-đối chứng âm; 2: DNA 559 bp khuếch đại từ plasmid *A. tumefaciens*)

3.5 Quy trình chuyển gen vào lá mầm cà chua

3.5.1 Khảo sát ảnh hưởng của mật độ quang vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens* (OD_{600nm}) đến hiệu suất chuyển gen

Kết quả khảo sát mật độ vi khuẩn cho thấy tỷ lệ mẫu có biểu hiện gen *GUS* cao nhất ở $OD_{600nm} = 1,0$ với tỷ lệ trung bình là 41%, khi OD_{600nm} là 0,5 thì biểu hiện của gen *GUS* chỉ đạt khoảng 21%. Tuy nhiên, khi tăng OD_{600nm} lên 1,5 thì biểu hiện của gen *GUS* lại có xu hướng giảm, chỉ đạt trung bình 26,6%.

Bảng 4: Biểu hiện của gen GUS ở các mật độ vi khuẩn khác nhau

OD _{600nm}	Phần trăm lá mầm biểu hiện gen GUS (%)
0,5	21 ^a ± 4,9
1,0	41 ^b ± 4,9
1,5	26,7 ^a ± 3,3
CV (%)	17,6
p	0,009

Ghi chú: Trong cùng một cột, các số trung bình có cùng chữ cái không có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ($p < 0,05$). Kết quả được thể hiện bằng số trung bình ± độ lệch chuẩn. Trắc nghiệm phân hạng sẽ được thực hiện theo phương pháp Tukey.

3.5.2 Khảo sát ảnh hưởng của nồng độ acetosyringone đến hiệu suất chuyển gen

Trước khi chuyển gen, acetosyringone sẽ được bổ sung vào dung dịch huyền phù vi khuẩn với các nồng độ 50; 100 và 150 μM để đánh giá ảnh hưởng của hợp chất phenolic đến hiệu suất chuyển gen. Mật độ vi khuẩn được sử dụng trong thí nghiệm này là OD_{600nm} = 1.

Bảng 5: Biểu hiện của gen GUS ở các nồng độ acetosyringone khác nhau

Acetosyringone (μM)	Số lá mầm biểu hiện gen GUS (%)
50	17,7 ^a ± 5,1
100	45,6 ^b ± 5,1
150	26,7 ^a ± 3,4
CV (%)	17,47
p	0,001

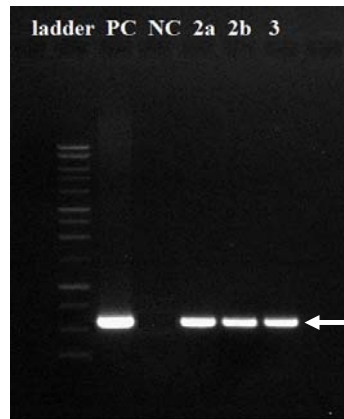
Ghi chú: Trong cùng một cột, các số trung bình có cùng chữ cái không có sự khác biệt có ý nghĩa về mặt thống kê ($p < 0,05$). Kết quả được thể hiện bằng số trung bình ± độ lệch chuẩn. Trắc nghiệm phân hạng sẽ được thực hiện theo phương pháp Tukey.

Kết quả chuyển gen của các tác giả trên thế giới có sự khác biệt rất lớn về mật độ vi khuẩn tối ưu, môi trường nuôi cấy cũng như biểu hiện của gen GUS. Theo Wu *et al.* (2004), sử dụng *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, plasmid pTOK233, OD_{600nm} = 0,15 trên cà chua Lichun cho biểu hiện GUS cao nhất 90,5%. Theo Sun *et al.* (2006), *Agrobacterium tumefaciens* C58C1Rif^R mang plasmid pIG121Hm chuyển gen trên giống Micro-Tom cho biểu hiện gen GUS 40%. Sharma *et al.* (2009) đã sử dụng *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 mang plasmid pCTBE2L hoặc pRINASE2L chuyển gen trên giống Pusa Ruby, Arka Vikas, và Sioux cho thấy hơn 90% số lá có biểu hiện GUS. Yasmeen (2009) đã sử dụng vi khuẩn mang vector pROKIIAPIGUSint hoặc pROKIIIFYGUSint với các gen *APETALA 1*, *LEAFY (LFY)*, *GUS* và *NPTII* để chuyển gen trên cà chua Rio Grande cho tỷ lệ tái sinh là 30,4% và biểu hiện GUS đạt 84%. Theo Van T Dang *et al.* (2010), *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 mang pSoup và pGII0229, OD_{600nm} = 0,5 cho tỷ lệ biểu hiện GUS cao nhất là 30,14% ở cà chua DM8.

3.5.3 Kiểm tra cây giả định chuyển gen

Kết quả PCR trên lá mầm sau 2 tuần chuyển gen và lá thật 3 tháng tuổi của cây tái sinh trong môi trường chọn lọc đã xác nhận sự xuất hiện của gen *CryIAb* trên gel. Như vậy, có thể kết luận rằng gen *CryIAb* đã được gắn vào bộ gen cà chua. Hiện tượng mô lá và chồi tái sinh có thể sống được trong môi trường có 50 mg/l kanamycin chứng tỏ gen *nptII* hoạt động tốt và tạo ra enzyme đủ để phân hủy kháng sinh. Cùng với biểu hiện của gen GUS thì *nptII* là gen thứ 2 trong cassette

đã hoạt động có hiệu quả. Mặt khác, kết quả kiểm tra bằng PCR đã xác định được gen mục tiêu *CryIAb* trong bộ nhiễm sắc thể của mô và lá cà chua tái sinh.



Hình 4: Kết quả PCR từ lá mầm chuyển gen 2 tuần tuổi, lá cà chua tái sinh 3 tháng tuổi [ladder: Thang chuẩn DNA 1 kb; PC: Băng DNA 559 bp được từ plasmid vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*; NC: đối chứng âm sử dụng lá mầm không chuyển gen; 2a, 2b: Băng DNA 559 bp được khuếch đại từ lá mầm chuyển gen 2 tuần tuổi; 3: Băng DNA 559 bp từ lá cây cà chua chuyển gen 3 tháng tuổi trong môi trường chọn lọc với kanamycin nồng độ 80 mg/l]

4 KẾT LUẬN

Chúng tôi đã xác định được môi trường tái sinh chồi và tạo rễ phù hợp cho cây cà chua *in vitro* từ lá mầm là MS bổ sung 0,5 mg/l BA, 0,5 mg/l kinetin, 0,1 mg/l IAA, 30 g/l sucrose, 8,4 g/l agar và pH 5,8. Ngưỡng gây chết của kanamycin sulphate đối với lá mầm là 50 mg/l. Việc nhân bản plasmid, kiểm tra gen *CryIAb* và biến nạp plasmid vào *Agrobacterium tumefaciens* đã được thực hiện thành công với sản phẩm plasmid là 11,6 kb tương ứng với plasmid gốc pCAMBIA 2301 và đoạn 4,2 kb tương ứng với đoạn cassette chứa gen. Sau khi ly trích plasmid từ vi khuẩn tái tổ hợp, chúng tôi đã xác nhận được sản phẩm khuếch đại của gen *CryIAb* là 559 bp. Mật độ $OD_{600nm} = 1$ và nồng độ 100 μ M acetosyringone cho tỷ lệ lá mầm biểu hiện gen *GUS* cao nhất với $45,6 \pm 5,1\%$. Kết quả PCR cho thấy có sự xuất hiện của gen *CryIAb* ở một số lá mầm chuyển gen 2 tuần tuổi và lá cà chua 3 tháng tuổi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Cortina C, and Macia CF, 2004. Tomato transformation and transgenic plant production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 76: 269 – 275.
- Davuluri RG, Tuinen VA, Freser DP, Manfredonia A, Newman R, Burgess D, Brummell AD, King RS, Palys J, Uhlig J, Bramley MP, Pennings JMH, and Bowler C, 2005. Fruit-specific RNAi-mediated suppression of *DETI* enhances carotenoid and flavonoid content in tomatoes. *Nature Biotechnology* 23 (7).
- FAOSTAT
<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>
- Frary A, and Earle DE, 1996. An examination of factors affecting the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato. *Plant Cell Reports* 16: 235 – 240.

- Hamza S, Chupeau Y, 1993. Re-evaluation of Conditions for Plant Regeneration and *Agrobacterium*-Mediated Transformation from Tomato (*Lycopersicon esculentum*). Journal of Experimental Botany 44 (12): 1837 – 1845.
- Jacobsen JH, 2007. Modern technologies in plant biotechnology. Genetic Engineering. Manual for plant genetic engineering course. Hannover University, 26 pages.
- Lin CW, Lu FC, Wu WJ, Cheng LM, Lin MY, Yang SN, Black L, Green KS, Wang FJ, and Cheng PC, 2004. Transgenic tomato plants expressing the *Arabidopsis NPR1* gene display enhanced resistance to a spectrum of fungal and bacterial diseases. Transgenic Research 13: 567 – 581.
- Ling QH, Kriseleit D, and Ganai WM, 1998. Effect of ticarcillin/potassium claculanate on callus growth and shoot regeneration in *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Plant Cell Reports 17: 843 – 847.
- Park HS, Morris LJ, Park EJ, Hirschi DK, and Smith HR, 2003. Efficient and genotype – independent *Agrobacterium* – mediated tomato transformation. Journal of Plant Physiology 160: 1253 – 1257.
- Qiu D, Diretto G, Tavarza R, and Giuliano G, 2007. Improved protocol for *Agrobacterium* mediated transformation of tomato and production of transgenic plants containing carotenoid biosynthetic gene CsZCD. Scientia Horticulturae 112: 172 – 175.
- Roekel J, Damm B, Melchers L, and Hoekema A, 1993. Factors influencing transformation frequency of tomato (*Lycopersicon esculentum*). Plant Cell Reports 12: 644 – 647.
- Sharma KM, Solanke UA, Jani D, Singh Y, and Sharma KA, 2009. A simple and efficient *Agrobacterium*-mediated procedure for transformation of tomato. J. Biosci 34: 423-433.
- Sun JH, Uchii S, Watanabe S, and Ezura H, 2006. A highly efficient transformation protocol for Micro-Tom, a model cultivar for tomato functional genomics. Plant Cell Physiol 47(3): 426 – 431.
- VanT Dang, Ferro N, and Jacobsen JH, 2010. Development of a simple and effective protocol for *Agrobacterium tumefaciens* mediated leaf disc transformation of commercial tomato cultivars. GM Crops 1(5): 312 – 321.
- Wu FY, Chen Y, Liang MX, and Wang ZX, 2006. An experimental assessment of the factors influencing *Agrobacterium*-mediated transformation in tomato. Russian Journal of Plant Physiology 53: 252-256.
- Yasmeen A (2009). An improved protocol for the regeneration and transformation of tomato (cv Rio Grande). Acta Physiologiae Plantarum.