

KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG TÁI SINH CỦA MỘT SỐ GIỐNG ĐẬU TƯƠNG VIỆT NAM PHỤC VỤ CHO CHỈNH SỬA GEN BẰNG CÔNG NGHỆ CRISPR/Cas9

Nguyễn Hữu Kiên^{1,*}, Hoàng Thảo Nguyên^{1,2},

Nguyễn Thị Hòa¹, Tống Thị Hương¹, Đinh Thị Thu Ngân¹,

Nguyễn Minh Hiếu^{1,2}, Lê Thị Ngọc Quỳnh³, Nguyễn Hải Anh¹,

Nguyễn Thành Đức¹, Nguyễn Văn Đồng¹, Phạm Xuân Hội^{1,*}

TÓM TẮT

Công nghệ chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)-associated protein 9 (Cas9)) đang cho thấy đây là một công cụ tiềm năng, đầy hứa hẹn trong cải tạo các tính trạng mong muốn của cây trồng. Một số nghiên cứu đã áp dụng kỹ thuật CRISPR/Cas9 để chỉnh sửa gen trên các giống đậu tương mô hình, để áp dụng kỹ thuật chỉnh sửa gen trên các giống đậu tương thương mại thì việc xây dựng quy trình tái sinh là vô cùng quan trọng, nhiệm vụ của nghiên cứu này là đánh giá khả năng tái sinh của các giống đậu tương DT2010, DT37 và DT51 trong điều kiện *in vitro*. Kết quả cho thấy, sự cảm ứng tạo đa chồi của giống đậu tương DT51, DT37 và DT2010 tối ưu nhất khi được cấy trong trường có bổ sung lần lượt là 2, 2,5 và 2,5 mg/L Benzylaminopurine sau 14 ngày nuôi cấy. Trong khi đó, khả năng kéo dài chồi của giống DT51, DT37 và DT2010 thể hiện tốt nhất khi được nuôi cấy trong môi trường có bổ sung lượng nước dừa tương ứng 50, 100 và 200 ml/L sau 21 ngày, thời gian ra rễ thích hợp nhất đối với 3 giống đậu tương này là 14 ngày trên môi trường ra rễ. Như vậy, quy trình tái sinh cho 3 giống đậu tương DT37, DT51 và DT2010 sẽ là tiền đề cơ sở để áp dụng kỹ thuật chỉnh sửa gen trực tiếp trên các giống đậu tương thương mại này.

Từ khóa: *Benzylaminopurine, chuyển gen, đậu tương, in vitro, nước dừa.*

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Đậu tương (*Glycine max* L.) là cây công nghiệp ngắn ngày có hiệu quả kinh tế và giá trị dinh dưỡng cao. Hạt đậu tương cung cấp lượng protein và dầu dồi dào để sản xuất lương thực và làm thức ăn chăn nuôi [1]. Mặc dù cây đậu tương có nhiều giá trị và được trồng nhiều nơi nhưng năng suất còn thấp do phụ thuộc vào các yếu tố môi trường canh tác. Các bất lợi phi sinh học như hạn, mặn,... là nguyên nhân chính làm giảm năng suất và chất lượng của đậu tương. Do đó, việc nghiên cứu cải tiến các đặc tính nông sinh học của cây đậu tương là rất cần thiết để phát triển giống có năng suất, chất lượng tốt và có khả năng thích nghi với các điều kiện bất lợi từ môi trường.

Để cải tiến các đặc tính nông sinh học liên quan đến năng suất, chất lượng và khả năng chống lại các bất lợi sinh học và phi sinh học của cây trồng, một số phương pháp đã được sử dụng như cách tiếp cận bằng chọn tạo truyền thống và các phương pháp chuyển gen thông thường [2]. Tuy nhiên, phương pháp này lại tốn thời gian, kinh phí hay mang các gen ngoại lai.

Công nghệ chỉnh sửa gen CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)-associated protein 9 (Cas9)) đã mở ra một kỷ nguyên mới cho chọn và tạo giống cây trồng. CRISPR/Cas9 được biết tới như là công nghệ mạnh mẽ và hiệu quả có thể chỉnh sửa có định hướng một hoặc nhiều gen đích của một nhóm cần thiết mà không làm ảnh hưởng tới các gen khác. Cho đến nay, công nghệ chỉnh sửa gen bằng CRISPR/Cas9 đã được nghiên cứu ứng dụng rộng rãi và thành công trên nhiều đối tượng cây trồng chính như lúa gạo, lúa mì, ngô... Các nghiên cứu gần đây của Nguyễn Hữu Kiên và cs (2020; 2022) [3, 4] đã

¹ Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ tế bào thực vật, Viện Di truyền Nông nghiệp

² Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

³ Khoa Hóa và Môi trường, Trường Đại học Thủy lợi

*Email: kienbio280888@gmail.com;

xuanhoi.pham@gmail.com

thiết kế và biến nạp thành công cấu trúc CRISPR/Cas9 mang các sgRNA cho chỉnh sửa gen *GmHyPRP1* (một gen của cây đậu tương liên quan tới quá trình chống chịu đa stress phi sinh học) vào giống đậu tương ĐT22 của Việt Nam. Kết quả này đã mở ra hướng đi mới trong chỉnh sửa chính xác gen liên quan tính trạng quan tâm ở cây đậu tương bằng công nghệ CRISPR/Cas9. Nhận thấy việc chỉnh sửa gen có định hướng trực tiếp trên các giống đậu tương thương mại của Việt Nam là vô cùng quan trọng. Tuy nhiên, mỗi giống đậu tương có đặc điểm di truyền khác nhau, điều này sẽ quyết định đến hiệu quả chỉnh sửa gen của cây đậu tương. Raza và cs. (2017) [5] đã đánh giá khả năng tái sinh của 9 giống đậu tương thương mại, kết quả cho thấy khả năng tái sinh của các giống đậu tương này là rất khác nhau. Trong khi đó, khả năng tái sinh của một số giống đậu tương của Việt Nam (MTĐ176, ĐT4, DT96, MTĐ652-5, HL202, ĐT22) cũng khác nhau tùy thuộc vào nền di truyền của từng giống [6, 7].

Do vậy, nghiên cứu này được thực hiện để đánh giá khả năng tái sinh của 3 giống đậu tương thương mại DT2010, ĐT37 và ĐT51 có thời gian sinh trưởng ngắn nhưng khả năng chống chịu bất lợi môi trường kém nhằm phục vụ cho chỉnh sửa gen có định hướng các giống đậu tương này bằng CRISPR/Cas9 thông qua *Agrobacterium tumefaciens*.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Hạt giống đậu tương ĐT37 và ĐT51 do Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Đậu đỗ chọn tạo và hạt giống đậu tương DT2010 do Bộ môn đột biến ưu thế lai, Viện Di truyền Nông nghiệp chọn tạo được lưu giữ tại Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ bảo thực vật, Viện Di truyền Nông nghiệp để sử dụng làm vật liệu nghiên cứu.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Đánh giá ảnh hưởng của BAP đến cảm ứng tạo đa chồi của các giống đậu tương

Hạt đậu tương được khử trùng khô bằng khí clo và cấy trên môi trường nảy mầm GM (B5 cơ bản [8] bổ sung 20 g/L đường sucrose, 9 g/L agar, pH 5,8) trong 5 ngày ở điều kiện 24°C, chu kỳ 18 giờ sáng và 6 giờ tối (điều kiện này được sử dụng trong suốt quá trình thí nghiệm) như đã trình bày ở nghiên cứu trước đây [4].

Sau giai đoạn nảy mầm, các hạt đậu tương đạt yêu cầu được cắt loại bỏ trụ dưới lá mầm, tách dọc lá

mầm thành 2 phần bằng nhau, loại bỏ chồi, tạo 7-8 vết thương theo phương pháp đã mô tả ở nghiên cứu trước đây [4]. Vùng trụ dưới lá mầm đặt nghiêng một góc 30-45° lên bề mặt của các công thức môi trường cảm ứng tạo chồi SIM (B5 cơ bản, bổ sung 30 g/L đường sucrose, 9 g/L agar, pH 5,7 kết hợp với các nồng độ Benzylaminopurine (BAP) khác nhau: 0, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5 mg/L) và theo dõi trong thời gian 21 ngày ở điều kiện như đã trình bày ở trên.

2.2.2. Đánh giá ảnh hưởng của nước dừa đến khả năng kéo dài chồi của các giống đậu tương

Các cụm mầm đa chồi từ SIM có bổ sung BAP phù hợp nhất được tạo vết cắt mới ở phần trụ dưới lá mầm rồi chuyển sang các công thức môi trường kéo dài chồi SEM (môi trường MS cơ bản [9] bổ sung 30 g/L đường sucrose, 9 g/L agar, pH 5,7 kết hợp với các lượng nước dừa khác nhau: 0, 50, 100, 150, 200, 250 ml/L) và theo dõi trong thời gian 21 ngày ở điều kiện như đã trình bày.

2.2.3. Đánh giá khả năng ra rễ tạo cây hoàn chỉnh của các giống đậu tương

Để đánh giá khả năng ra rễ của các giống đậu tương, các chồi (>3 cm) từ các cụm chồi của công thức SEM có bổ sung nước dừa thích hợp nhất được ngâm trong axit Indole-3-butyric (IBA) 1 mg/mL 1-2 phút như mô tả trước đó của Nguyễn Hữu Kiên và cs (2022) [4] và đặt vào ống nghiệm có chứa môi trường ra rễ RM (MS cơ bản bổ sung 20 g/L đường sucrose, 3 g/L Phytigel, pH 5,6) và theo dõi trong 21 ngày ở điều kiện như đã trình bày.

2.2.4. Các chỉ tiêu theo dõi và phương pháp xử lý số liệu

Khả năng tái sinh của các giống đậu tương được theo dõi và đánh giá thông qua các chỉ tiêu sau:

- Tỷ lệ đa chồi (%) = (số mẫu nhiều hơn 2 chồi ở mỗi công thức SIM/tổng số mẫu ở mỗi công thức SIM) x 100.

- Tỷ lệ cụm chồi đẹp (%) = (số mẫu có cụm chồi li ti, có màu xanh và kích thước đều nhau ở mỗi công thức SIM/tổng số mẫu ở mỗi công thức SIM) x 100.

- Tỷ lệ ra rễ (%) = (số mẫu ra rễ ở mỗi công thức RM/tổng số mẫu ở mỗi công thức RM) x 100.

- Tỷ lệ mẫu kéo dài (%) = (số mẫu có chồi kéo dài ở mỗi công thức SEM/tổng số mẫu ở mỗi công thức SEM) x 100.

Ngoài ra, chiều dài chồi được theo dõi và đánh giá trên các công thức SEM tại mỗi thời điểm khác

nhau; chiều dài rễ và số lượng rễ được theo dõi và đánh giá trên môi trường RM tại các thời điểm khác nhau.

Các thí nghiệm được tiến hành 3 lần nhắc lại. Số liệu được tính toán và xử lý thống kê bằng phương pháp phân tích phương sai (ANOVA).

2.3. Thời gian và địa điểm nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện từ tháng 7 năm 2021 đến tháng 6 năm 2022 tại phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ tế bào thực vật, Viện Di truyền Nông nghiệp.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

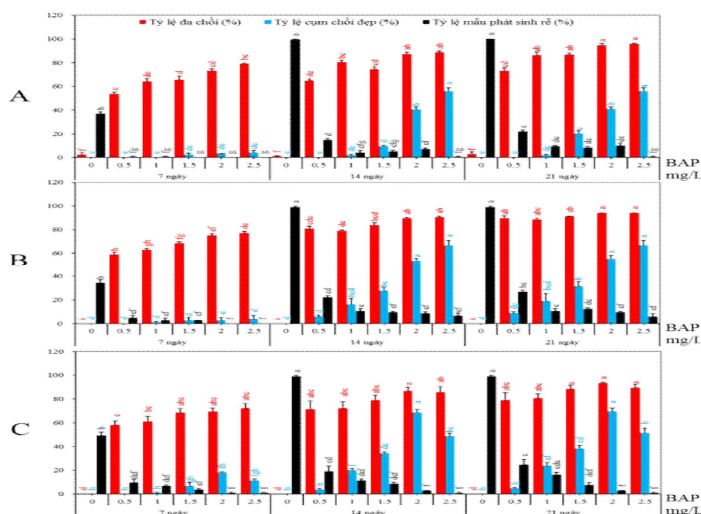
3.1. Ảnh hưởng của BAP đến khả năng cảm ứng tạo đa chồi của các giống đậu tương DT51, DT37 và DT2010

BAP là một hóc-môn thực vật thuộc nhóm cytokinin có hiệu ứng sinh học đa dạng ở thực vật. BAP là chất kích thích sinh trưởng được sử dụng để kích thích khả năng phân chia tế bào đặc biệt là phân hóa chồi trong nhân giống *in vitro* thực vật. Trong khi đó, trong các quy trình biến nạp gen vào đậu tương, BAP luôn được sử dụng trong giai đoạn cảm ứng tạo đa chồi [4, 10, 11, 12]. Điều này chỉ ra, BAP đóng vai trò là một cytokinin không thể thiếu trong giai đoạn tái sinh của đậu tương. Do vậy, trong nghiên cứu này đã tiến hành đánh giá ảnh hưởng của

BAP đến khả năng cảm ứng tạo đa chồi của 3 giống đậu tương DT2010, DT37 và DT51.

Hạt đậu tương của 3 giống DT2010, DT37 và DT51 sau khi nảy mầm 5 ngày trên môi trường GM có tỷ lệ xanh đồng đều được sử dụng cho thí nghiệm đánh giá khả năng cảm ứng tạo đa chồi trên môi trường SIM có bổ sung nồng độ BAP khác nhau như đã trình bày trong phần phương pháp. Kết quả đánh giá khả năng cảm ứng tạo đa chồi và một số chỉ tiêu khác của 3 giống đậu tương DT2010, DT37 và DT51 được trình bày như trong hình 1.

Kết quả ở hình 1 cho thấy, khi môi trường SIM bổ sung BAP thì các giống đậu tương đều cho phản ứng tạo đa chồi ở tất cả các thời điểm so với môi trường không bổ sung BAP. Trong đó, cả 3 giống đậu tương cho tỷ lệ đa chồi tốt nhất khi bổ sung 2 và 2,5 mg/L BAP ở tất cả các thời điểm theo dõi. Tuy nhiên, tỷ lệ chồi đẹp của 3 giống này có sự khác biệt giữa các công thức bổ sung BAP khác nhau, trong khi giống đậu tương DT2010 và DT37 đạt tỷ lệ chồi đẹp nhiều nhất 55,95 và 66,67% ở môi trường SIM bổ sung 2,5 mg/L BAP, thì giống DT51 cho tỷ lệ 68,57% ở SIM bổ sung 2 mg/L BAP sau 14 ngày nuôi cấy trên môi trường SIM và tỷ lệ này không có sự thay đổi nhiều sau 21 ngày. Ngoài ra, tỷ lệ phát sinh rễ của 3 giống đậu tương giảm dần khi tăng nồng độ BAP trong môi trường SIM. Nồng độ 2 và 2,5 mg/L BAP tại cả 3 thời điểm mẫu phát sinh rễ ít nhất (Hình 1).



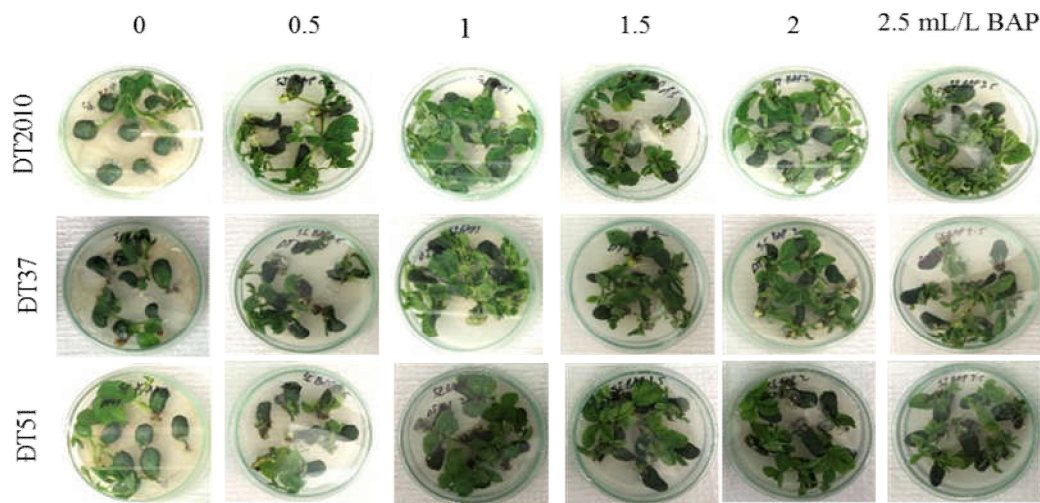
Hình 1. Ảnh hưởng của BAP đến khả năng tạo chồi của 3 giống đậu tương DT2010, DT37 và DT51 trên môi trường SIM

Ghi chú: Ảnh hưởng của BAP đến cảm ứng tạo chồi của DT2010 (A), DT37 (B) và DT51 (C). Thí nghiệm được thực hiện 3 lần nhắc lại, 50 mẫu/công thức/lần nhắc lại. Các chữ cái khác nhau cùng màu của mỗi biểu đồ thể hiện sự khác biệt trong cùng tiêu chí đánh giá giữa các nồng độ khác nhau ở các thời điểm bằng phương pháp phân tích phương sai (ANOVA) với p -value < 0,05.

Các kết quả nghiên cứu chuyển gen vào nút lá mầm của các giống đậu tương thông qua vi khuẩn *A. tumefaciens* ở giai đoạn cảm ứng tạo chồi đều được bổ sung BAP vào môi trường SIM; tuy nhiên, nồng độ thích hợp lại tùy thuộc vào từng giống đậu tương. Theo Olhoft và cs (2003) [10], Zeng và cs (2004) [11], sử dụng 1,67 mg/L BAP trong giai đoạn cảm ứng tạo đa chồi của giống đậu tương Bert. Một nghiên cứu khác khi chuyển cấu trúc chỉnh sửa gen vào giống đậu tương ĐT22 cũng sử dụng 1,67 mg/L BAP bổ sung vào môi trường SIM cho cảm ứng tạo

đa chồi [4]. Trong khi đó, giai đoạn cảm ứng tạo đa chồi của quy trình chuyển gen vào các giống đậu tương (Jack, Zigongdongdou, Williams 82 và Heihe 27) sử dụng 1 mg/L BAP [12]. Các kết quả này cho thấy, sự cảm ứng đa chồi phụ thuộc vào đặc trưng của từng giống đậu tương được sử dụng.

Như vậy, nồng độ BAP thích hợp ở giai đoạn cảm ứng tạo đa chồi trên môi trường SIM của giống đậu tương ĐT2010 và ĐT37 là 2,5 mg/L và ĐT51 là 2 mg/L sau 14 ngày nuôi cấy (Hình 2).



Hình 2. Hình ảnh cảm ứng tạo chồi của 3 giống đậu tương DT2010, ĐT37 và ĐT51 trên SIM có bổ sung các nồng độ BAP khác nhau sau 14 ngày nuôi cấy

3.2. Ảnh hưởng của nước dừa đến khả năng kéo dài chồi của các giống đậu tương ĐT51, ĐT37 và DT2010

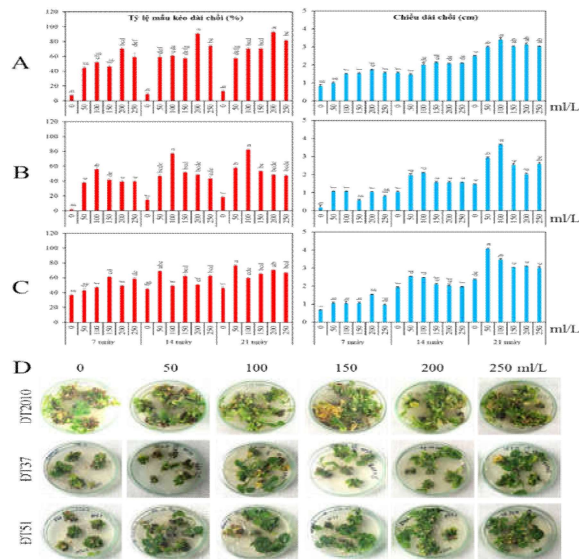
Trong quy trình chuyển gen vào đậu tương, sự kéo dài chồi của các mẫu sống sót trên môi trường SEM có bổ sung chất chọn lọc đóng vai trò quan trọng đến thành công của chuyển gen. Hầu hết các nghiên cứu chuyển gen vào đậu tương, khi kéo dài chồi đều bổ sung zeatin vào môi trường SEM [10, 11, 12, 13]. Tuy nhiên, zeatin là một trong những kích thích sinh trưởng thuộc nhóm cytokinin có chi phí đắt nên rất khó để áp dụng trong điều kiện nuôi cấy mô của Việt Nam. Theo Mooi và cs (2015) [14], nước dừa có chứa thành phần các hợp chất hữu cơ, chất khoáng và kích thích sinh trưởng, trong đó có zeatin và được sử dụng rộng rãi trong nghiên cứu *in vitro* nhiều loại cây trồng.

Trong nghiên cứu này, đã sử dụng nước dừa như nguồn thay thế zeatin ở giai đoạn kéo dài chồi trên môi trường SEM đối với 3 giống đậu tương DT2010,

ĐT37, ĐT51 và thu được kết quả được thể hiện ở hình 3.

Đối với giống đậu tương DT2010, lượng nước dừa bổ sung vào môi trường SEM ở 200 ml/L cho tỷ lệ mẫu kéo dài chồi tốt nhất, đạt trên 90% sau 14 và 21 ngày. Tuy nhiên, chiều dài chồi của giống đậu tương DT2010 sau 7 và 14 ngày giữa các công thức SEM có bổ sung nước dừa và đối chứng không bổ sung thì không có sự khác biệt nhiều, nó chỉ thể hiện rõ sau 21 ngày. Cụ thể, chiều dài đạt tốt nhất của giống DT2010 là trên SEM có bổ sung 100 ml/L nước dừa so với không bổ sung hoặc bổ sung ít 50 ml/L, nhưng không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê so với công thức SEM bổ sung 150, 200 và 250 ml/L (Hình 3A và D).

Trong khi đó, giống đậu tương ĐT51 lại cho ra tỷ lệ mẫu kéo dài chồi cao nhất khi môi trường SEM chỉ cần bổ sung 50 ml/L nước dừa, đạt tỷ lệ trung bình 76,34% sau 21 ngày và trung bình chiều dài chồi cũng là tốt nhất (Hình 3C-D).



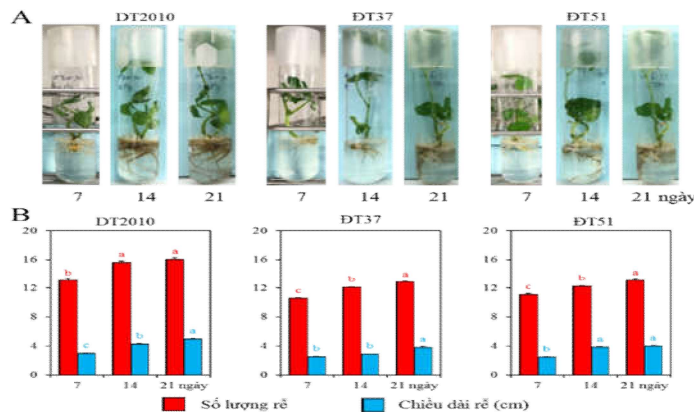
Hình 3. Ảnh hưởng của nước dừa đến khả năng kéo dài chồi của 3 giống đậu tương DT2010, DT37 và DT51

Ghi chú: Tỷ lệ mẫu kéo dài chồi và chiều dài của DT2010 (A), DT37 (B) và DT51 (C) trên môi trường SEM có bổ sung lượng nước dừa khác nhau. Thí nghiệm được thực hiện 3 lần nhắc lại, 18 mẫu/công thức/lần nhắc lại. (D) Hình ảnh kéo dài chồi của 3 giống đậu tương trên SEM có bổ sung nước dừa khác nhau sau 21 ngày nuôi cấy. Các chữ cái khác nhau cùng màu của mỗi biểu đồ thể hiện sự khác biệt trong cùng tiêu chí đánh giá giữa các nồng độ khác nhau ở các thời điểm bằng phân tích phương sai (ANOVA) với p -value < 0,05.

Nghiên cứu trước đây cũng đã bổ sung 150 ml/L nước dừa trong giai đoạn kéo dài chồi khi biến nạp gen vào giống đậu tương DT22 [4]. Kết quả chỉ ra rằng, việc bổ sung nước dừa vào giai đoạn kéo dài chồi trên môi trường SEM của 3 giống đậu tương là cần thiết, tuy nhiên lượng nước dừa bổ sung tùy thuộc vào từng giống. Cụ thể, nước dừa thích hợp bổ

sung cho môi trường kéo dài chồi của giống đậu tương DT2010 là 200 ml/L, DT37 là 100 ml/L và DT51 là 50 ml/L sau 21 ngày nuôi cấy để đạt chiều dài chồi thích hợp nhất cho chuyển sang môi trường ra rễ để tạo cây hoàn chỉnh ở thí nghiệm tiếp theo.

3.3. Đánh giá khả năng ra rễ của các giống đậu tương DT2010, DT37 và DT51



Hình 4. Khả năng ra rễ tạo cây hoàn chỉnh của 3 giống đậu tương DT2010, DT37 và DT51 trên môi trường RM

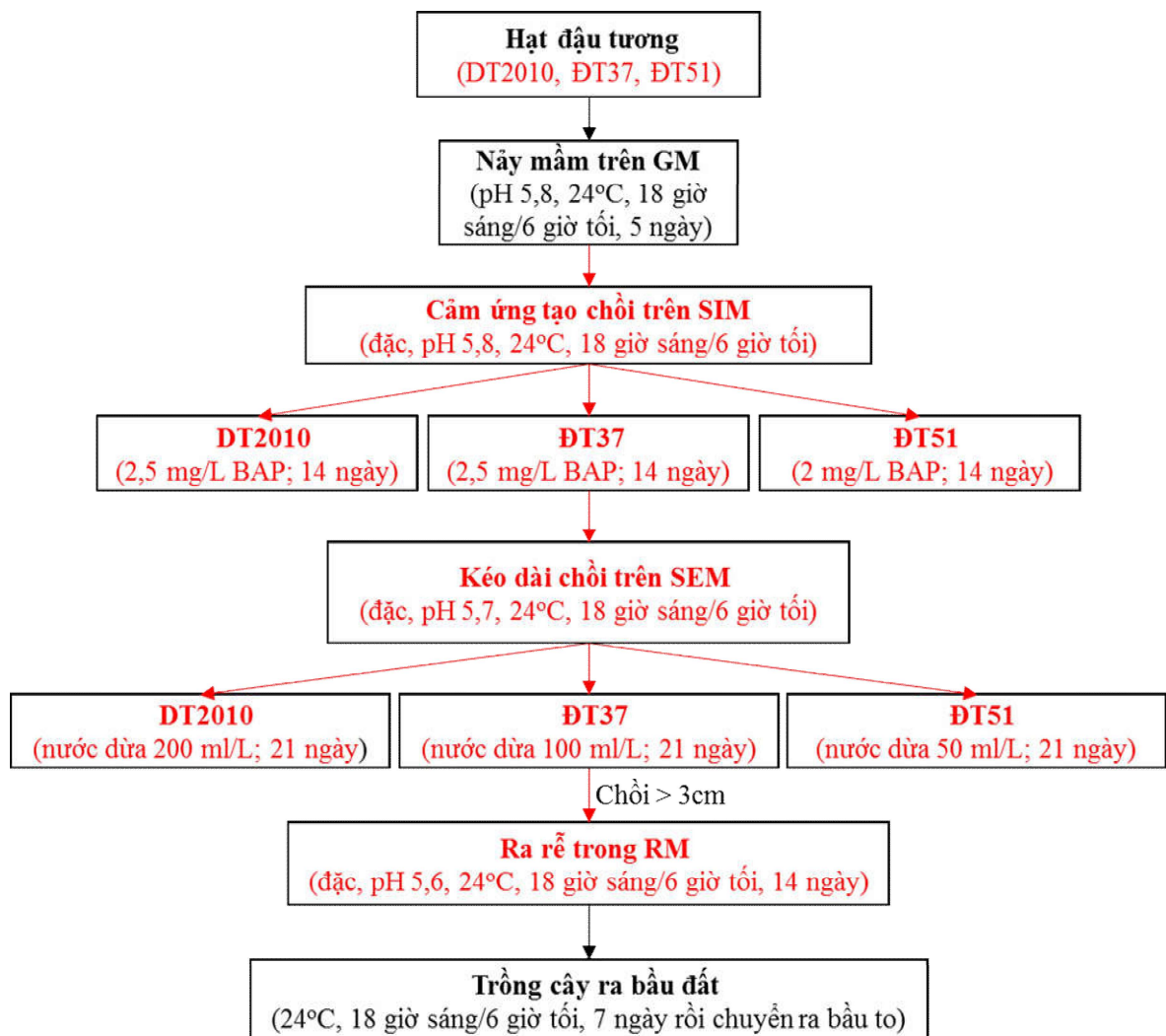
Ghi chú: A, hình ảnh ra rễ của DT2010, DT37 và DT51 ở thời điểm 7, 14 và 21 ngày sau khi chuyển sang RM; B, trung bình số lượng rễ và chiều dài rễ của DT2010, DT37 và DT51 trên môi trường RM tại các thời điểm. Thí nghiệm được thực hiện 3 lần nhắc lại, 10 mẫu/lần nhắc lại. Các chữ cái khác nhau cùng màu của mỗi biểu đồ thể hiện sự khác biệt trong cùng tiêu chí đánh giá giữa các thời điểm khác nhau bằng phân tích phương sai (ANOVA) với p -value < 0,05.

Để đánh giá khả năng ra rễ của các giống đậu tương, những chồi dài trên 3 cm từ công thức SEM bổ sung nước dừa tối ưu nhất cho từng giống ở thí nghiệm trên được nuôi trong môi trường RM đặc với thành phần môi trường và điều kiện như trình bày ở phương pháp.

Đối với giống đậu tương DT2010, số lượng rễ trung bình trong 7 ngày đầu tiên đạt 13,07 rễ/cây, sau 14 ngày số lượng rễ tăng thêm không nhiều, chỉ đạt 15,63 rễ/cây và sau 21 ngày không có sự khác biệt; chiều dài trung bình rễ đạt 2,98 cm ở ngày thứ 7 và lần lượt đạt 4,27 và 4,97 cm sau 14 và 21 ngày (Hình 4A-B). Trong khi đó, khả năng phát sinh của giống DT37 trên RM chỉ đạt 10,57 rễ/cây và DT51 là 11,10 rễ/cây sau 7 ngày nuôi cấy, số rễ cho phát sinh nhiều nhất của DT37 trung bình chỉ là 12,87 rễ/cây và DT51 là 13,1 sau 21 ngày nuôi cấy. Chiều dài rễ của giống đậu tương DT37 lần lượt là 2,54, 2,88 và 3,81 cm sau 7, 14 và 21 ngày nuôi cấy trên RM và của

giống DT51 được ghi nhận tại thời điểm tương ứng là 2,49, 3,83 và 3,99 cm. Tuy nhiên, đặc điểm chung của 3 giống đậu tương này là khi duy trì chúng trên RM sau 14 ngày thì có chấm đen xuất hiện tại các đầu rễ và đạt nhiều nhất khi quan sát tại thời điểm 21 ngày. Đây là nguyên nhân làm cho các cây chuyển ra đất sinh trưởng phát triển kém đã được làm rõ ở các nghiên cứu trước đây [4; 15]. Như vậy, thời gian ra rễ thích hợp để tạo cây hoàn chỉnh của cả 3 giống đậu tương DT2010, DT37 và DT51 ở môi trường RM là 14 ngày.

Các cây hoàn chỉnh đủ điều kiện được chuyển ra bầu đất nhỏ và chăm sóc trong phòng nuôi ở điều kiện 24°C, với chu kỳ 18 giờ sáng/6 giờ tối khoảng 1 tuần trước khi chuyển sang bầu to và chăm sóc ngoài nhà lưới đến khi thu hoạch. Qua nghiên cứu này, đã hoàn thiện quy trình tái sinh 3 giống đậu tương DT2010, DT37 và DT51 được mô tả như trong hình 5.



Hình 5. Hoàn thiện quy trình tái sinh 3 giống đậu tương DT2010, DT37 và DT51.

4. KẾT LUẬN

Quy trình tái sinh cho 3 giống đậu tương DT2010, DT37 và DT51 đã được xây dựng thành công. Hệ thống tái sinh này là một giai đoạn đóng vai trò quan trọng đến hiệu quả chuyển cấu trúc chỉnh sửa gen vào cây đậu tương. Kết quả này là tiền đề cho chỉnh sửa hệ gen cây đậu tương bằng công nghệ CRISPR/Cas9 trong tương lai.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Cai Y., Chen L., Liu X., Sun S., Wu C., Jiang B., Han T., Hou W. (2015). CRISPR/Cas9-mediated genome editing in soybean hairy roots. *PLoS ONE*, 10(8): 1–13.
2. Ahmar S., Gill R. A., Jung K.H., Faheem A., Qasim M. U., Mubeen M., Zhou W. (2020). Conventional and molecular techniques from simple breeding to speed breeding in crop plants: Recent advances and future outlook. *Int J Mol Sci*, 21(7): 1–24.
3. Nguyễn Hữu Kiên, Vũ Văn Tiến, Nguyễn Trung Anh, Lê Thị Mai Hương, Đoàn Thị Hải Dương, Đinh Thị Mai Thu, Nguyễn Thị Hòa, Tống Thị Hương, Đinh Thị Thu Ngân, Phạm Xuân Hội, Jae-Yean Kim, Nguyễn Văn Đồng (2020). Thiết kế hệ thống vector CRISPR/Cas9 để chỉnh sửa gen *GmHyPRP1*, một gen của cây đậu tương liên quan tới quá trình chống chịu đa stress phi sinh học. *Tạp chí Nông nghiệp và PTNT*, 24: 10-17.
4. Nguyễn Hữu Kiên, Nguyễn Thị Hòa, Tống Thị Hương, Nguyễn Trung Anh, Đinh Thị Thu Ngân, Chu Đức Hà, Phạm Vũ Long, Đinh Thị Mai Thu, Lê Thị Mai Hương, Jae-Yean Kim, Vũ Văn Tiến, Phạm Xuân Hội, Lê Đức Thảo, Nguyễn Văn Đồng (2022). Kết quả biến nạp cấu trúc CRISPR/Cas9 chỉnh sửa gen *GmHyPRP1* vào giống đậu tương DT22 thông qua vi khuẩn *Agrobacterium tumefaciens*. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam, số chuyên đề dành cho Đoàn Thanh niên VAAS*, 133:20-26.
5. Raza G., Singh M. B., Bhalla P. L. (2017). *In vitro* plant regeneration from commercial cultivars of soybean. *Biomed Res Int*, 7379693.
6. Trần Thị Cúc Hòa (2007). Nghiên cứu khả năng đáp ứng biến nạp gen của các giống đậu tương trồng ở Việt Nam. *Tạp chí Nông nghiệp và PTNT*, 18:9-14.
7. Nguyễn Văn Đồng, Nguyễn Mai Hương, Nguyễn Hữu Kiên (2012). Nghiên cứu quy trình biến nạp gen vào giống đậu tương DT22 thông qua *Agrobacterium tumefaciens*. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Nông nghiệp Việt Nam*, 9(39):119-124.
8. Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res*, 50(1): 151-158.
9. Murashige T., Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol plant*, 15: 473–497.
10. Olhott P. M., Flagel L. E., Christopher M. D. Somers D. A. (2003). Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method. *Planta*, 216: 723-735.
11. Zeng P., Vadnais D. A., Zhang Z., Polacco J. C. (2004). Refined glufosinate selection in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. *Plant Cell Rep*, 22(7): 478-482.
12. Chen L., Cai Y., Liu X., Yao W., Guo C., Sun S., Wu C., Jiang B., Han T., Hou W. (2018). Improvement of soybean *Agrobacterium*-mediated transformation efficiency by adding glutamine and asparagine into the culture media. *Int J Mol Sci*, 19(10): 3039.
13. 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 DT22. *Tạp chí Nông nghiệp và PTNT*, 11:3-9.
14. Mooi C. M. Y., Koh S. P., Long K. (2015). Simultaneous detection and quantification of zeatin and kinetin in coconut water using ultra performance liquid chromatography coupled with a simple step solid phase extraction. *J Anal Chem*, 70(7): 819-824.
15. Nguyễn Văn Đồng, Nguyễn Anh Vũ, Lê Thị Mai Hương, Nguyễn Trung Anh. Nghiên cứu chuyển gen GmNAC004 vào giống đậu tương DT22 thông qua vi khuẩn *Agrobacterium*. *Tạp chí Khoa học Công nghệ nông nghiệp Việt Nam*, 3(76): 13-17.

**THE REGENERATIVE STUDY OF SOME VIETNAMESE SOYBEAN CULTIVARS IN *IN VITRO*
FOR SERVING GENE EDITING BY CRISPR/Cas9**

**Nguyen Huu Kien^{1,*}, Hoang Thao Nguyen^{1,2}, Nguyen Thi Hoa¹,
Tong Thi Huong¹, Dinh Thi Thu Ngan¹, Nguyen Minh Hieu^{1,2},
Le Thi Ngoc Quynh³, Nguyen Hai Anh¹, Nguyen Thanh Duc¹,
Nguyen Van Dong¹, Pham Xuan Hoi^{1,*}**

¹National Key Laboratory for Plant Cell Biotechnology, Agricultural Genetics Institute

²Faculty of Biotechnology, Vietnam National University of Agriculture

³Faculty of Chemistry and Environment, Thuyloi University

**Email: kienbio280888@gmail.com; xuanhoi.pham@gmail.com*

Summary

Gene editing technology by CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)-associated protein 9 (Cas9)) shows that this is a potential and promising tool in improving desired plant traits. Several studies have used the CRISPR/Cas9 to edit genes on model soybean cultivars. To edit a target gene or multiple genes on commercial soybean varieties by the CRISPR/Cas9 technique, building a regeneration process is extremely important. Therefore, in this study, we evaluated the regeneration ability of soybean cultivars DT2010, DT37 and DT51 *in vitro* conditions. The results showed that the induction of multiple shoots of soybean varieties DT51, DT37 and DT2010 were the most optimal when cultured in medium supplemented with 2, 2.5 and 2.5 mg/L Benzylaminopurine, respectively, after 14 days. Meanwhile, the shoot elongation of cultivars DT51, DT37 and DT2010 showed best when cultured in medium applied with 50, 100 and 200 ml/L coconut water, respectively, after 21 days. In addition, the most suitable rooting time for these three soybean cultivars was 14 days on rooting medium. Thus, the regeneration process for these 3 soybean cultivars DT2010, DT37 and DT51 will be the basis for applying gene editing techniques directly on these commercial soybean varieties.

Keywords: *Benzylaminopurine, coconut water, in vitro, soybean, transformation.*

Người phản biện: PGS.TS. Nguyễn Phương Thảo

Ngày nhận bài: 20/10/2022

Ngày thông qua phản biện: 9/11/2022

Ngày duyệt đăng: 16/11/2022